



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**FRECUENCIA DE METALO-BETALACTAMASA EN  
*Pseudomonas aeruginosa* DE ORIGEN NOSOCOMIAL  
EN EL HOSPITAL PEDIATRICO DE TERCER NIVEL**

TESINA

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**ESPECIALISTA EN BIOQUIMICA CLINICA**

P R E S E N T A

**QBP JAIME SALINAS MAGAÑA**



**TUTOR. DRA NORMA VELAZQUEZ GUADARRAMA**

**México D.F. 01 DE JUNIO DE 2011**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a todo mi comité tutorial por sus valiosas enseñanzas, críticas y facilidades ofrecidas para la realización de este trabajo.

Gracias al apoyo y valiosos consejos metodológicos brindados por la Dra. Norma Velazquez Guadarrama

Agradezco al Colegio de Profesores-Investigadores del Posgrado en la Especialización en Bioquímica Clínica de la Universidad Nacional Autónoma de México por sus grandes enseñanzas para mi formación.

Agradezco al Departamento de Bacteriología Intestinal del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”, por todo su apoyo y enseñanzas en la realización de este trabajo.

# INDICE

1.0	Resumen	1
2.0	INTRODUCCION	2
3.0	Generalidades	5
3.1	Bacilos gram- negativos no fermentadores	5
3.2	Habitad	6
3.3	El género <i>pseudomonas</i>	6
3.4	Morfología	7
3.5.	Requerimientos nutricionales	7
3.6	Distribución	7
3.7	Patogenicidad	8
3.8	Pili o fimbrias	8
3.9	Capsula	8
4.0	Exoenzima s	9
4.1	Elastasa ó elastina	9
4.2	Proteasa alcalina	9
4.3	Fosfolipasa c	9
4.4	Citotoxina	10
4.5	Pigmentos y sideróforos	10
4.6	Epidemiología	11
4.7	Reservorios inanimados	11
4.8	Reservorios animados	12
4.9	Importancia Clínica	12
5.0	Aislamiento e identificación	14
5.1	Prevención y control	15
5.2	Tratamiento	16
6.0	Mecanismos de resistencia	18
6.1	Bombas de expulsión activa	19
6.2	Porinas de membrana	20
6.3	Betalactamasas	21
6.4	Metalo-betalactamasas (MBLs)	22
7.0	Antibióticos	22
7.1	Resistencia antimicrobiana	23
7.2	Métodos de difusión en disco	24
7.3	Concentración Inhibitoria Mínima (CMI)	24
7.4	Métodos de concentración inhibitoria mínima (CMI)	24
7.5	Lectura interpretativa del antibiograma	25
8.0	Electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE)	26
9.0	HIPOTESIS	30
10.	OBJETIVOS	30
10.1	OBJETIVOS PARTICULARES	30
10.2	Muestra	31
10.3	Criterios de inclusión	31
11.0	MATERIALES Y METODOS	32
11.1	Cepas	32
11.2	Revalidación	33



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3. Frecuencia de aislamientos de <i>pseudomonas aeruginosa</i> Según el sitio de aislamiento	36
Figura 4. Perfil de susceptibilidad de <i>pseudomonas aeruginosa</i> de origen nosocomial de periodo julio 2008 a julio 2009. del HIMFG.	37
Figura 5. Frecuencia de metalo-betalactamasa de <i>pseudomonas aeruginosa</i> .	38
Figura 6. Árbol filogenético.	39

## RESUMEN

*Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno oportunista causante de infecciones nosocomiales, por lo que se le considera un problema de salud pública mundial. Uno de los tratamientos empleados para combatir este patógeno es el uso de antibióticos carbapenémicos, constituidos por imipenem (IMP) y meropenem (MERO). La acción de estos antibióticos sobre la bacteria es a nivel de la síntesis de la pared celular actuando directamente en las proteínas unidoras de penicilina. Existen tres mecanismos de resistencia a estos antibióticos en *P. aeruginosa*: 1) Producción de metalo-betalactamasas (MBLs), enzimas que inactivan el antibiótico; 2) Cambios en la permeabilidad de la bacteria mediante la pérdida de la porina OprD, impidiendo la penetración del antibiótico a la bacteria, 3) Sobre expresión de las bombas de flujo, expulsando el antibiótico de la bacteria que impide la acción de éstos en las membranas. El objetivo es evaluar el perfil de susceptibilidad y la distribución poblacional de los aislamientos de *P. aeruginosa* de origen nosocomial. De un total de 25 cepas se evaluó la concentración mínima inhibitoria por diluciones en agar a los antibióticos amikacina, aztreonam, cefepime, piperacina/tazobactam, trobamicim, levofloxacina, ceftazidima, ciprofloxacina, imipenem, meropenem, se identifica a las cepas productoras de metalo-betalactamasas, mediante la técnica de difusión en doble disco, uno de ellos impregnados con una solución de EDTA (0.025 mM). La diversidad poblacional se realizó mediante la técnica de campos pulsados (PFGE), empleando las enzimas de corte SPEI I. Los resultados mostraron sensibilidad de 57.6% a Imipenem y Meropenem 61.6%. Se mostró la presencia de 11 % cepas portadores de metalo-betalactamasas de aislamientos de *P. aeruginosa* de origen nosocomial. El perfil de susceptibilidad realizado por la técnica de Concentración Mínima Inhibitoria, mostro un incremento en la resistencia del 25 % a carbapenems .Se determinó la presencia de enzimas (carbapenemasas) en 25 % de los aislamientos recuperados empleando discos de EDTA (0.025 Mm). Se identificó la relación clonal por (PFGE). En el análisis del electroferograma, se observó que las muestras analizadas presentan una similitud máxima del 80%, y 60% lo que indica que se trata de cepas diferentes en comparación (entre ellas.)

## INTRODUCCION

*Pseudomonas aeruginosa* constituye uno de los patógenos aislados con mayor frecuencia en pacientes hospitalizados. El tratamiento de las infecciones graves causadas por este microorganismo suele ser difícil debido a que *P. aeruginosa* es naturalmente resistente a una gran variedad de antimicrobianos. *P. aeruginosa* es multidrogo resistente incluyendo los carbapenems que es el tratamiento de elección, por este motivo es la necesidad de establecer la frecuencia de aislamientos resistentes a dichos antibióticos.<sup>3</sup> Al adquirir metalo-betalactamasas (MBLs) puede ser resistente a la totalidad de los antimicrobianos disponibles para su tratamiento. Por ello, es cada vez más frecuente la necesidad de emplear los carbapenems, antibióticos  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro y con actividad contra la mayoría de los patógenos, con la consiguiente selección de aislamientos resistentes que reflejan el 26% de resistencia a ambos a ambos carbapenems.<sup>4</sup> *P. aeruginosa* puede exhibir resistencia tanto en forma disociada a imipenem (IMP) o meropenem (MER) como también a ambos carbapenems simultáneamente. La resistencia sólo a MER está frecuentemente asociada a la bomba de expulsión del sistema MexA-MexB-OprM<sup>6</sup>. Por su parte el mecanismo de resistencia a IMI más común es la impermeabilidad originada por el déficit de la proteína OprD.<sup>3</sup> Sumado a la presencia de  $\beta$ -lactamasas cromosómicas tipo AMP-C.<sup>11</sup> En algunas ocasiones la expresión del sistema de expulsión activa denominado MexE-MexF-OprN podría estar implicada en la resistencia a IMP.<sup>4</sup> La resistencia simultánea a ambos carbapenems indica, o bien la co-existencia de dichos mecanismos, o la producción de enzimas con capacidad de hidrolizarlos, denominadas carbapenemasas<sup>11</sup>. Estas enzimas pueden corresponder a serino-enzimas o metalo-betalactamasas (MBLs). Las serino-carbapenemasas son enzimas de clase A o D de Ambier.<sup>1</sup> Son responsables en general, de la resistencia a carbapenems en enterobacterias y *Acinetobacter* spp, respectivamente. Las MBLs, pertenecientes a la clase B de Ambier, y al grupo 3 de la clasificación de Bush *et al*<sup>1</sup>, constituyen las carbapenemasas adquiridas de mayor relevancia clínica, debido a que tienen capacidad de hidrolizar a todos los antibióticos betalactámicos, excepto el



aztreonam (AZT). Existen dos tipos dominantes de MBLs, IMP y VIM, cada uno con múltiples variantes alélicas.<sup>23</sup> Las enzimas tipo IMP fueron descritas inicialmente en Japón en 1991 y han sido encontradas frecuentemente en enterobacterias y bacterias gram-negativas no fermentadoras mientras que las VIM fueron detectadas originalmente en Europa en 1999. Estas enzimas han sido descritas fundamentalmente en *P. aeruginosa* y otros no fermentadores.<sup>23</sup> La enzima SPM-1, descrita en 1997, y la GIM-1 son también MBLs, cuyas secuencias difieren significativamente de las enzimas tipo IMP y VIM. Recientemente se ha reportado una nueva MBL denominada SIM-1.<sup>2</sup> Prácticamente todos los genes codificantes conocidos de las enzimas tipo IMP y VIM, así como GIM-1, se encuentran como genes en *cassetes* localizados en integrones de clase 1, asociados a genes codificantes de enzimas modificadoras de aminoglucósidos. Aunque pueden localizarse en integrones de clase 3.<sup>2</sup> Los integrones tienen la capacidad de reclutar genes en *cassetes* por un mecanismo de recombinación sitio específico entre un elemento de 59 pares de bases en el gen en *casete* y el sitio *attE* 1 en el integrón.<sup>2</sup> Si bien los genes en *cassetes* tienen la posibilidad de desplazarse de un integrón a otro, estos últimos no son un sistema eficiente de transferencia entre bacterias y por lo tanto no es inusual su inclusión dentro de otros elementos como transposones o plásmidos. En los últimos años se ha registrado a nivel mundial, especialmente en Europa y Asia, un notable incremento en el estudio de nuevas MBLs y en la diseminación entre microorganismos relacionados e incluso no relacionados.<sup>2</sup>

Sin embargo, en nuestro país la presencia de estas enzimas fue detectada por primera vez en el año 2002.<sup>1</sup> Debido a que la resistencia a carbapenemes en *P. aeruginosa*, a diferencia de lo que sucede con las enterobacterias, es frecuente en nuestro medio y considerando que distintos mecanismos pueden contribuir a la misma es probable que sin la búsqueda activa, la participación de las MBLs en los aislamientos clínicos haya sido subestimada. Teniendo en cuenta la capacidad de los quelantes para interactuar con el Zn<sup>2+</sup> del sitio activo, muchos ensayos fenotípicos empleados en la detección de MBLs han empleado distintas combinaciones de este tipo de inhibidores.<sup>22</sup>

El objetivo de trabajo fue conocer la susceptibilidad, la frecuencia de metalo-betalactamasas, identificar la distribución poblacional mediante la técnica de campos pulsados (PFGE).<sup>8</sup>

### **3. Generalidades**

#### **3.1 Bacilos gram-negativos no fermentadores**

Las bacterias gram-negativas son causantes de alrededor del 50% de los casos de sepsis, al menos la mitad de los pacientes hospitalizados tienen un hemocultivo positivo. Entre el 50 y 60% de bacteriemias producidas por bacterias gram-negativas se complican con choque séptico. Esto se debe a la baja necesidad de nutrientes de bacilos gram- negativos, no fermentadores lo que les permite sobrevivir durante periodos prolongados en superficies inanimadas. Esta parte de la biota transitoria de las manos de médicos y enfermeras y la elevada mortalidad atribuible comparada con otros bacilos gram- negativos. El otro aspecto importante de los bacilos no fermentadores es la susceptibilidad a los antibióticos ya que estos microorganismos con frecuencia presentan una elevada resistencia.<sup>4</sup>

Dentro de los microorganismos denominados bacilos gram-negativos, se encuentra un amplio grupo con características especiales. En ellos están los bacilos gram-negativos no fermentadores, estos son un grupo heterogéneo de microorganismos aerobios, no fermentadores, no esporulados, que son incapaces de utilizar hidratos de carbono como fuentes de energía a través de la vía fermentativa sin embargo, alguno de ellos tienen la capacidad de utilizar algunos hidratos de carbono mediante la vía oxidativa.<sup>15</sup>

La glucosa es la principal fuente de carbono para las bacterias y la degradación bacteriana ocurre por diferentes vías; los bacilos gram-negativos no fermentadores utilizan la vía Entner-Doudoroff también denominada vía aerobia porque requiere de oxígeno para glucólisis. En esta vía la glucosa es oxidada a 6-fosfogluconato y 2-ceto-deoxi-6-fosfogluconato antes de que se forme ácido pirúvico. Algunas bacterias utilizan vías de derivación a través de las cuales la glucosa es oxidada directamente a ácido glucurónico y cetoglucurónico sin la fosforilación inicial. En cualquier caso se forma ácido pirúvico. Al carecer de la enzima deshidrogenasa necesaria para oxidar el ácido pirúvico a ácido láctico y otros ácidos mixtos, las bacterias oxidativas transfieren los hidrógenos disponibles del ácido pirúvico al ciclo de krebs donde los iones finales unen con el oxígeno para formar agua.<sup>20</sup>

## 3.2 Hábitat

Los bacilos gram-negativos no fermentadores son organismos ambientales que pueden encontrarse en la naturaleza como ambientes del suelo, agua, plantas, incluyendo frutas y vegetales. Su capacidad para crecer en ambientes secos, acuosos, a elevadas temperaturas, les permite ser organismos oportunistas causantes de infecciones intrahospitalarias al alojarse en soluciones desinfectantes, jabones, fluidos para diálisis, ventiladores, tuberías, etc. Estos microorganismos aprovechan cualquier estado de alteración o debilitamiento del huésped para infectarlo (la inmunodeficiencia, el uso de medicamentos potentes, maniobras instrumentales y prolongados procedimientos quirúrgicos, prolongado tiempo en unidades de cuidados intensivos, entre otros).<sup>31</sup>

## 3.3 El género *Pseudomonas*

Contiene más de 140 especies la mayoría saprofitos; sin embargo, a unas 25 especies se les asocia con el humano, sobretodo en infecciones oportunistas. El género *Pseudomonas* comprende bacterias gram-negativas, de metabolismo oxidativo, son citocromooxidasa positivos, catalasa positivos, son móviles por uno o más flagelos y no forman esporas. Por años se ha reclasificados a los microorganismos que pertenecen a este género, esto se debe a las técnicas innovadoras como la hidratación de ácidos que permite relacionar y clasificar a las distintas especies. Dentro del género *Pseudomonas* la especie que ha recibido mayor atención *P. aeruginosa* debido a dos causas; la frecuencia con que está involucrada en enfermedades humanas, las infecciones producidas por este microorganismo normalmente son severas y difíciles de tratar debido a la resistencia que presenta a diversos antibióticos, que son favorecidos a la condición inmunocomprometida del huésped.<sup>7</sup>

### 3.4 Morfología

*Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo gram-negativo recto o ligeramente curvo, no esporulado, que mide 1.5 a 5  $\mu\text{m}$  de largo y 0.5 a 1  $\mu\text{m}$  de ancho. Se puede encontrar de manera aislada, en pares y ocasionalmente, en cadenas cortas. Es móvil por ello poseen un singular flagelo polar, pero ocasionalmente tiene 2 o 3 flagelos.<sup>15</sup>

### 3.5 Requerimientos nutricionales

*Pseudomonas aeruginosa* se definen como aerobios obligados, es decir, que el oxígeno actúa como aceptor terminal de electrones, es posible su crecimiento en condiciones de anaerobiosis usando nitrato o arginina como aceptores terminales de electrones. Sus requerimientos nutricionales son mínimos y usan de manera impresionante compuestos naturales y artificiales como fuente de carbono. *P. aeruginosa* no fermenta los carbohidratos y si utiliza alguno de ellos lo hace de manera oxidativa, además es extremadamente adaptable ya que puede metabolizar más de 80 compuestos orgánicos para su crecimiento.<sup>15</sup>

### 3.6 Distribución

*P. aeruginosa* no se encuentra como parte de la biota microbiana de la piel y el tracto digestivo de humanos y animales. Aunque es incapaz de causar enfermedades en personas sanas, es un patógeno oportunista que causa severas infecciones en personas inmunocomprometidas como pacientes con cáncer, antibióticoterapias de amplio espectro, quimioterapias. Por su habilidad de sobrevivir en ambientes acuosos, estos organismos causan problemas en el ambiente hospitalario, *P. aeruginosa* se encuentra en una variedad de soluciones acuosas incluyendo desinfectantes, jabones, fluidos de irrigación, gotas de ojos, sueros salinos, agua destilada etc. Los fregaderos los baños de hidroterapia, las regaderas, los equipos de terapia respiratoria, y los humidificadores son importantes reservorios. *P. aeruginosa* se puede encontrar en piscinas, tinas calientes, soluciones de lentes de contacto, cosméticos, drogas inyectables ilícitas y todas estas son fuentes de infección.<sup>9</sup>

### 3.7 Patogenicidad

*P. aeruginosa* no produce enfermedades en personas sanas; sin embargo, la bacteria es patógena para las personas inmunocomprometidas, por otra parte el tracto respiratorio de pacientes que padecen fibrosis quística (FQ) terminan invariablemente por ser colonizados por variantes alternamente productoras de biopelículas. Cuando se introduce en pacientes inmunocomprometidos, la bacteria se fija en mucosa o a la piel, las coloniza las invade de manera local y produce enfermedad general. Estos procesos encuentran apoyo en los factores de virulencia.

### 3.8 Pili o fimbrias

Los pilis son estructuras cortas, parecidas al pelo, que intervienen en la adherencia a las células huésped o facilitan el intercambio de DNA durante la conjugación bacteriana. En el caso de *P. aeruginosa* esta estructura median la adherencia de la bacteria al epitelio respiratorio *P. aeruginosa* no se adhieren al epitelio intacto normal. *In vitro*, los pilis actúan como adhesinas en las células epiteliales bucales y traqueales, pero no se han identificado las moléculas receptoras en las células epiteliales. Las cepas con pili se adhieren mejor al epitelio traqueal lesionado.

### 3.9 Cápsula

Muchas bacterias están rodeadas por una capa de polisacárido que a veces se denomina capsula, capa de moco (slime) o glicocalix que son polisacáridos unidos por enlaces glucosídicos, La producción de mucopolisacarido es frecuentemente llamada mucoide porque la colonia que la produce tiene un aspecto mucoide. Esta capa mucosa es particularmente evidente en aislamientos de personas con FQ, donde la relación volumen / peso de la capa puede exceder el de la célula bacteriana entera. Los polisacáridos permiten que las bacterias se adhieren entre sí, formando micro colonias en los pulmones de los enfermos con neumonía por *P. aeruginosa* y la matriz anionica circulante también protege a la gran masa bacteriana de los fagocitos y de la acción de los anticuerpos y del complemento. Se cree que el alginato es necesario para la persistencia de *Pseudomonas aeruginosa* en los pacientes con FQ. Aunque solo 0.8 a 2% de todas las infecciones por *Pseudomonas* se deben a las cepas mucoides, 80 a 90% de los pacientes con FQ presentan infecciones.<sup>12</sup>

## **4.0 Exoenzima S**

Esta toxina extracelular es producida aproximadamente por 90% de los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* y puede inhibir la síntesis de proteínas distintas del factor de elongación 2. Entre sus blancos se encuentran la vimentina y diversas proteínas que se enlazan con el triptófano de guanosina (GTP). Como esta proteína de enlace GTP participa en el desplazamiento de los lisosomas, es probable que proteja a las *P. aeruginosa* de los polimorfonucleares y macrófagos.

### **4.1 Elastasa ó Elastina**

La elastina es una proteína que forma cerca del 30% de las proteínas en el tejido pulmonar. Su nombre se debe al hecho que permite al tejido tener las propiedades elásticas necesarias, y dado que el pulmón tiene la función de contraer y expulsar aire este requiere de expansión y reducción de los alveolos. La elastina es además una enzima capaz de catalizar la destrucción de las fibras elásticas en las paredes de los vasos sanguíneos lo que conduce a las lesiones hemorrágicas que se encuentra en las infecciones diseminadas.<sup>26</sup>

### **4.2 Proteasa alcalina**

Se sabe menos de esta, pero se cree que esta contribuye a la inmunosupresión y necrosis porque rompe gran diversidad de proteínas, incluso interleucina y diversas moléculas de adhesión leucocitaria.<sup>3</sup>

### **4.3 La fosfolipasa C**

La fosfolipasa C descompone los lípidos y la lecitina con la que se facilita la destrucción tisular. *P. aeruginosa* produce tipos la hemolítica y la no hemolítica, ambas degradan la fosforilcolina, que es el constituyente principal de la sustancia tenso activa pulmonar. La degradación de la fosforilcolina libera diacilglicerol y colina, estimula mas síntesis de fosfolipasa C hemotilica y conduce a la formación de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos. Estos productos del metabolismo de araquidonato tal vez contribuyen a los cambios patológicos que ocurren en los pulmones de los sujetos con FQ y con enfermedades respiratorias crónicas.<sup>4</sup>

## 4.4 Citotoxina

Originalmente se llamó leucocidina por su capacidad para destruir polimorfonucleares. Esta se enlaza con la membrana de las células huésped, forma huecos de 1 nm en la membrana ocasionando la lisis celular.<sup>7</sup>

## 4.5 Pigmentos y Sideróforos

*P. aeruginosa* pueden producir varios pigmentos entre los cuales podemos mencionar la piocianina, la pioverdina y la piorrubina. La producción de piocianina se ha usado por mucho tiempo como un rasgo de diagnóstico de *P. aeruginosa*, pero también puede funcionar como un factor de virulencia. La piocianina se ha relacionado con el daño de tejido endotelial in vitro, y una explicación de cómo la piocianina ocasiona el daño del tejido, es la siguiente: la piocianina que es un derivado de la fenazina este puede catalizar la conversión de NADH-dependiente de oxígeno a superóxido y peróxido de hidrógeno. Estos dos reactivos formados del oxígeno son más tóxicos que el oxígeno, pero son mucho menos tóxicos que otros reactivos formados del oxígeno o radicales hidroxilo. En sus formas libre y ligada el hierro puede catalizar la conversión del radical superóxido y peróxido dentro del radical hidroxilo, capaz de causar daño tisular. Así, la combinación de la piocianina y pioquelina ambos son producidos por la bacteria que crece en el huésped, podría ser una contribución significativa al daño tisular, especialmente en áreas ricas en oxígeno como el pulmón.<sup>15</sup>



## 4.6 Epidemiología

*P. aeruginosa* se consideraba un patógeno nosocomial de gran relevancia y común. Se relaciono como el agente causal del 10% de infecciones nosocomiales reportadas. En el tracto urinario *P.aeruginosa* fue el segundo patógeno más común mientras que en caso de pulmonía fue el patógeno principal.<sup>15</sup>

## 4.7 Reservorios inanimados

Los mayores vehículos para *P. aeruginosa* se transmiten dentro de los hospitales por comidas y agua de grifo. Los vegetales son los alimentos más comúnmente contaminados y las proporciones de cultivo positivos de en salas han ido del 11 al 44%. La concentración *Pseudomonas aeruginosa* en vegetales individuales o ensaladas es de  $10^3$  UFC/G, en sistema de agua de grifos calientes y fríos en hospitales suelen ser sumamente bajos.<sup>15</sup>

Estudios para determinar si los aislamientos medioambientales de *P. aeruginosa* causan colonización o infección de pacientes han implicado las fuentes potenciales como, suministro de agua de grifo, sifón de grifo, fregadero o desagüe del fregadero, fuente de agua o la máquina de hielo, vórtice o tanque de hidroterapia, agua para humidificación, agua no estéril, los microorganismos son sensibles a la resequedad, de modo que no se diseminan con facilidad sobre fómites. En vez de ello, a menudo se diseminan a través del agua que se emplea para limpieza de respiradores, nebulizadores, así como las flores que traen los visitantes o ensaladas verdes de consumo. La simple recuperación de *Pseudomonas* en una fuente ambiental significa muy poco sin evidencia epidemiológica de que la zona contaminada actúa como reservorio de infecciones.<sup>15</sup>

## 4.8 Reservorios animados

La colonización de pacientes por *P. aeruginosa* constituye un importante reservorio, particularmente en unidades de cuidado especiales donde se exponen pacientes a antibióticos de amplio espectro, manos de personal de salud. Los estudios de cultivos han demostrado que la tasa de colonización es del 4 al 58% en pacientes onco-hematológicos, 13 a 39% en pacientes de cuidados intensivos(UCI), 19 a 43% en pacientes de cirugía y 2 a 51% en unidades de cuidado . Los pacientes inmunocomprometidos son los que tienen mayor probabilidad de enfermarse. Así mismo se encuentran personas que han recibido antibióticos intravenosos de amplio espectro y quienes padecen diabetes mellitus, leucemia, neutropenia, FQ, quemaduras, úlceras oculares, lesiones traumáticas, o tienen un catéter fijo. Factores que se han asociados en estudios individuales con un crecimiento en el riesgo de colonización incluyen ileostomía o colostomía, intubación traqueal, traqueotomía, ventilación mecánica, terapias antimicrobianas de alto espectro, anemia. *P. aeruginosa* es frecuentemente intrahospitalaria y la proporción de pacientes con cultivos positivos normalmente aumenta por lo menos 50%.

## 4.9 Importancia Clínica

*P. aeruginosa* es uno de los patógeno más importante con respecto al número y tipo de infecciones causadas asociadas a la movilidad y mortalidad. Este patógeno puede infectar cualquier tejido. El espectro de enfermedades causadas por este agente va desde las infecciones superficiales de la piel a sepsis. La comunidad que adquiere infecciones por *P. aeruginosa* son individuos inmunocomprometidos, estas tienden a ser localizadas y frecuentemente se asocian a contaminación del agua o soluciones. La disminución de las defensas del huésped pueden deberse a la rotura de la integridad de la piel (quemaduras), el uso de dispositivos médicos como, catéter intravenoso, sondas urinarias, tubos endotraqueales o la presencia de una enfermedad subyacente (cáncer, FQ).<sup>14</sup>

TABLA 3. INFECCIONES CAUSADAS POR *Pseudomonas aeruginosa*  
FUENTES DE INFECCION Y SUJETOS DE RIESGOS

Tipo de Infección	Fuente de Infección	Sujeto de Riesgo
Foliculitis	Piscinas, tinas calientes y esponjas contaminadas.	Lesiones cutáneas.
Bacteremia	Infecciones del tracto respiratorio, tracto urinario, la piel y los tejidos blandos.	Pacientes con neutropenia, diabetes mellitus, quemaduras, neoplasias malignas hematológicas.
Sistema Nervioso Central (meningitis y abscesos cerebrales).	Traumatismo, diseminación hematogena por extensión directa a partir de infecciones auriculares crónica o sinusitis.	Persona con cáncer
Oculares	Soluciones de lentes de contacto y el uso de agua de grifo durante el cuidado de los lentes.	Personas que utilizan lentes de contacto
Osteomielitis de calcáneo	Almohadilla del zapato de lona	Niños
Endocarditis	Drogas inyectables contaminadas (mas que las drogas en si el material y el agua que se utilizan para su preparación).	Personas que se administran drogas inyectables.
Huesos y articulaciones	Diseminación hematogena a partir del sitio de infección o por extensión directa de la infección a partir del sitio contiguo.	Personas que usan droga vía hematogena, infecciones urinarias o pélvicas
Tracto respiratorio	Equipo de ventilación o nebulizadores contaminados.	Pacientes con enfermedades pulmonares crónicas o insuficiencias cardiacas congénitas, cáncer y neutropenias.
Vías Urinarias	Sonda	Pacientes con sondas urinarias, prostatitis crónicas o calculas renales.

## 5.0 Aislamiento e identificación

Debido a que *Pseudomonas aeruginosa* requiere nutrientes muy simples, esta crece fácilmente en la mayoría de medios de cultivo, sus colonias alcanzan un diámetro entre 1.5 a 3 mm tras una incubación de 18 a 24 h a 37° C. Sus colonias son planas extendidas y de bordes irregulares. *Pseudomonas aeruginosa* producen un olor dulce como de uvas maduras o como de tortillas de maíz y puede diferenciarse de otras bacterias por su crecimiento a 42° C.

En agar sangre las colonias son planas, con aspecto rugoso o de vidrio molido y beta hemolíticas. Estas colonias pueden alcanzar un diámetro de 3 – 5 mm a las 48 h de incubación. Las cepas mucosas se aíslan principalmente de pacientes con FQ y pueden tener un color verde amarillento y son extremadamente mucosas, el material mucoso puede ser tan abundante que llega a deslizarse sobre la placa cuando esta se inclina.<sup>1</sup>

Más del 95% de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* puede identificarse observando la presencia de tres características primarias: 1) Pigmento piocianina, 2) Pigmento fluoresceína y 3) Actividad de citocromo oxidasa.

La mayor parte de las cepas producen piocianina un pigmento de fenacina verde e hidrosoluble que imparte un color verdoso al medio de cultivo. El agar *Pseudomonas* P o medio King A potencia la elaboración de la piocianina la detección del olor como de las uvas también es un indicio útil cuando se examina el crecimiento en placas; las colonias son grandes pueden ser mucoide o secas y a menudo se dispersan, algunas cepas puede producir pigmentos de otros colores: piourubina (rojo), piomielina (marron o negro) y pioverdina (amarillo).<sup>31</sup>

La fluoresceína puede observarse con el uso de una fuente de luz ultravioleta de onda corta (lampara de Wood). El medio *Pseudomonas* F o medio King B aumenta la síntesis de fluoresceína e inhibe la producción de piocianina. El agar Mueller-Hinton también es adecuado para demostrar la fluoresceína. La producción de fluoresceína puede incrementarse si los cultivos se incuban de 20 a 30° C en lugar de 35 a 37°C. *P. aeruginosa* es oxidasa positiva, existen características adicionales útiles para identificar cepas no productoras de pigmentos de *Pseudomonas aeruginosa*: crecimiento a 42° C, alcalinización de acetamida presencia de nitratos y nitritos, movilidad por medio de flagelos.<sup>15</sup>

## 5.1 Prevención y control

TABLA 4. Fuentes de contaminación de *Pseudomona aeruginosa* y sus medidas de prevención.

Fuente de Contaminación	Medidas de Prevención
Agua de Grifo	Supervisión constante de los sistemas de distribución (principalmente después de almacenamiento y/o tratamiento)
Agua no estéril (baños de agua y agua de floreros)	No deben de estar en aéreas de cuidado de pacientes o en aéreas donde se prepara equipo médico o se guarda el mismo.
Dispositivo de humidificación	Uso de agua estéril en los dispositivos de humidificación.
Antisépticos y desinfectantes	Sobre todo aquellos que deben mezclarse se deben usar a concentraciones adecuados y deben de ser activos contra no fermentadores.
Equipo Medico( endoscopios, hemodializadores o componentes reutilizables de dispositivos respiratorios)	Estos deben esterilizarse o desinfectarse.
Viales Multidosis	Evitar su uso en lo posible
Personal Sanitario	Debe de darse mucho énfasis a las prácticas asépticas de rutina y tener mucho cuidado con el manejo del paciente, de tal forma que se evite el traslado del microorganismo de sitios colonizados a sitios no colonizados susceptibles a infección. Cuando los brotes son causados por transmisión paciente a paciente la tensión aumenta a la practicas asépticas es la medida del mando primaria.
Escenarios de alto-riesgo	Vigilancia periódica para descubrir la incidencia de casos esporádicos a la ocurrencias de casos en grupo debido a no fermentadores. En los casos de grupo debe investigarse para identificar el campo de transmisión o en el medio ambiente la fuente de transmisión para prevenir potencialmente casos.
Comida	Excluir en la dieta de los pacientes inmunocomprometidos verduras crudas.

## 5.2 Tratamiento

Los tratamientos de elección son penicilinas antipseudomonas (ticarcilina y piperacilina), los aminoglucocidos (gentamicina, tobramicina y amikacina), quinolonas (ciprofloxacilina), cefalosporinas (cefoperazona, ceftazidima) y carbapenems (meropenem e imipenem). La susceptibilidad es menor predecible para otras cefalosporinas de amplio espectro (ceftriaxona y cefotaximina), monobactámico aztreonem.<sup>14</sup> El organismo es resistente a penicilinas antiestafilococicas, ampicilina, amoxicilina-acido clavulinico, ampicilina-subactam, tetraciclinas, macrolidos, rodamina, cloranfenicol, cefalosporinas de bajo y amplio espectro y cefalosporinas orales de amplio espectro (cefixima y cefpodoxima). Aislamiento de *P. aeruginosa* adquiridas nosocomialmente tiende a ser más resistentes a agentes antimicrobianos que las que adquieren en la comunidad. El desarrollo de resistencia durante la monoterapia con cualquier agente con los activos de la pared (penicilinas antipseudomonas, cefoperazona y ceftazidima) o ciprofloxacina ocurren frecuentemente. Las pruebas de susceptibilidad de los aislamientos de *P. aeruginosa* recuperados de secreciones respiratorias de pacientes con FQ presentan un especial desafío en microbiología clínica por dos razones. Varias diferencias morfológicas de los aislamientos están a menudo presentes en esputo de estos pacientes. Aunque frecuentemente se relaciona clonalmente, estos morfotipos individuales pueden tener diferentes antibiogramas.<sup>19</sup> Estudios hechos al comparar pruebas de morfo tipos individuales con pruebas de mezclas de estos morfotipos han demostrado que pruebas a morfotipos-mixtos no demuestran la resistencia con tanta precisión como lo hacen los morfotipos individuales. Segundo la exactitud de las pruebas comerciales de susceptibilidad disponibles para el morfotipo mucóide solo se ha evaluado en el E-test. Aunque estas técnicas mostraron buena correlación como método de referencia la concentración Inhibitoria mínima (CIM), es demasiado caro para establecerlo como pruebas de rutina. La fundación de FQ recomienda las pruebas de difusión en discos de *P. aeruginosa* recuperadas de FQ. En la fase final de la infección pulmonar crónica de FQ. *P. aeruginosa* puede ser resistente a los agentes antimicrobianos disponibles. En estos pacientes la dosis alta a tobramicina en aerosol puede ser de valor. Debe notarse que usando la

estrategia del tratamiento, la concentración utilizada de tobramicina en las vías aéreas debe estar en un rango de 100 un 200g/ml de la secreción. Por consiguiente los laboratorios involucrados en el cuidado de estos pacientes debe poder ofrecer pruebas de CIM o pruebas para determinar el CIM de tobramicina de estos organismos resistentes especialmente en los rasgos de 200 ug/ml. El éxito de la terapia para las infecciones de *Pseudomonas* requieren en general empleo combinado de aminoglucozidos (tobramicina) y betalactámicos antipseudomonas (azlocilina, y piperacilina o ceftazidima

## 6.0 Mecanismos de resistencia

*P. aeruginosa* es resistente de manera natural y adquirida, a un gran número de antibióticos; como, cefalosporinas de primera y segunda generación, tetraciclinas, cloranfenicol y macrólidos.<sup>13</sup> Esto se debe a las características de su membrana celular que tiene propiedades excepcionales de impermeabilidad. La resistencia a los antibióticos usualmente activos sucede en el medio hospitalario. Las cepas pueden transmitirse entre ellas el material genético que media la resistencia, incluso a partir de otras bacterias gram -negativas como las enterobacterias. Otro factor preocupante es la capacidad de *P.aeruginosa* de tornarse resistente en el curso del tratamiento antibiótico. Los mismos antibióticos son capaces de inducir los mecanismos de resistencia que un aislamiento tiene latentes. Otras sustancias como el zinc, componente de una clase de catéteres urinarios, también inducen cambios moleculares que activan la resistencia a imipenem.<sup>22,27</sup> Se ha evidenciado que en 10.2% de los tratamientos para *P.aeruginosa* emerge una cepa resistente que antes del tratamiento era sensible. Esta inducción de resistencia varía dependiendo de cada antibiótico. Por ejemplo, ceftazidima, una cefalosporina de tercera generación con actividad antipseudomonas, tiene el más bajo riesgo de inducir resistencia en bacterias previamente sensibles a ceftazidima; en contraste, imipenem presenta la más alta tasa de emergencia de resistencia después del tratamiento.<sup>14,18</sup>

Existen pocas opciones para el efectivo tratamiento de las infecciones por microorganismos multirresistentes. Los antibióticos que se consideran con buena actividad son: las penicilinas antipseudomonas (piperacilina, ticarcilina, carbenicilina, azlocilina), ceftazidima, cefepime, monobactámicos como aztreonem, carbapenémicos (imipenem y meropenem), quinolonas especialmente ciprofloxacina y aminoglicósidos. Sin embargo, ante el surgimiento de aislamientos multirresistentes a veces es necesario acudir a antibióticos que se consideraban fuera de uso por su alta toxicidad como las polimixinas. Los principales mecanismos de resistencia en *P. aeruginosa* comprenden: presencia de betalactamasas y alteraciones de la permeabilidad de membrana dadas por la presencia de bombas de expulsión y las mutaciones de las porinas transmembranales.<sup>13</sup>



## 6.1 Bombas de expulsión activa

Las bombas de expulsión son complejos enzimáticos de membrana, que expulsan de la célula detergentes y sustancias antipáticas que de otra manera destruirían la bacteria. Antes de la era de los antibióticos, *P. aeruginosa* ya poseía estos complejos enzimáticos, este complejo llamado MexAB-OprM, se compone de una proteína bomba en la membrana citoplasmática, una proteína ligadora en el espacio periplásmico y un canal de salida en la membrana externa. Tiene la capacidad de expulsar al exterior de la bacteria y contra un gradiente de concentración,  $\beta$ -lactámicos, cloranfenicol, quinolonas, macrólidos, novobiocina, sulfonamidas, tetraciclinas y trimetoprim. Estos sistemas de expulsión son los responsables de la "impermeabilidad" a la mayoría de los antibióticos. Las bombas de expulsión, tienen también la capacidad de ser inducidas por antibióticos, especialmente ciprofloxacina; además, los cambios mutacionales, incluso de una sola base nucleotídica en el DNA cromosómico de la bacteria, pueden sobreexpresar estas bombas. La sobreexpresión de MexAB-OprM, compromete la acción de quinolonas, penicilinas, cefalosporinas e incluso meropenem pero no imipenem. La sobreexpresión de otra bomba de expulsión, MexEF-OprN, confiere resistencia a quinolonas y algunos  $\beta$ -lactámicos, que incluyen meropenem e imipenem. Esta última bomba tiene una importante particularidad debido a que su expresión está estrechamente relacionada con el gen MexT, que también está involucrado en la mutación que origina la pérdida de la porina OprD como se verá más adelante. La sobreexpresión de MexXY-OprM afecta a los *B*-lactámicos, las quinolonas, el meropenem y los aminoglicósidos sin afectar la acción del imipenem.<sup>14,23</sup>

La resistencia mediada por bombas de expulsión se sospecha por un antibiograma que demuestra resistencia a las penicilinas y cefalosporinas antipseudomonas, que también afecta la susceptibilidad a meropenem, imipenem o aminoglicósidos dependiendo de la clase de bomba.

## 6.2 Porinas de membrana

Las porinas son proteínas transmembranales que se ubican en la membrana externa de las bacterias y cumplen diversas funciones. OprD es una porina de membrana presente en *P. aeruginosa*.

Su papel primitivo es permitir la captación pasiva de aminoácidos básicos a través de la membrana externa . Se sabe además, que es capaz de permitir la entrada de carbapenémicos, aunque no de otros  $\beta$ -lactámicos. La afinidad y la capacidad de difusión de imipenem a través de esta porina es casi 70 veces más alta que la de meropenem. El imipenem tiene la capacidad de seleccionar durante el tratamiento cepas que muestran mutaciones en la porina OprD, que demuestran disminución de la afinidad y el transporte de este antibiótico a través de esta proteína. Estas cepas mutantes muestran un aumento de la concentración in mínima inhibitoria (CIM) para imipenem, lo que las hace francamente resistentes a este carbapenémico. Con respecto a meropenem, estas cepas mutantes también han demostrado un aumento de la CIM <sup>5</sup>. La mutación de la topoisomerasa tipo II, sitio blanco de ciprofloxacina, confiere una resistencia aislada a esta quinolina. <sup>5</sup> Desde el punto de vista epidemiológico este mecanismo se considera menos importante, debido a que en el medio hospitalario el aumento de la resistencia a ciprofloxacina, está asociado con mayor frecuencia a bombas de expulsión que tienen como sustrato a este antibiótico. <sup>23,27</sup>

### 6.3 Betalactamasas

Las betalactamasas son enzimas que hidrolizan el anillo  $\beta$ -lactámico de los antibióticos, de esta manera destruyen el sitio activo del antibiótico e impiden su actividad. Las  $\beta$ -lactamasas se caracterizan por su capacidad de inhibir determinados subgrupos de  $\beta$ -lactámicos, es por esto que algunas subclasificaciones las denominan, penicilinasas, cefalosporinasas o carbapenemasas, dependiendo de la familia de  $\beta$ -lactámicos que tenga mayor susceptibilidad a ser atacadas por la enzima. Así mismo, estas enzimas son susceptibles de ser inhibidas por los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas como el clavulanato, sulbactam y tazobactam, aunque no todas son susceptibles ni responden de igual forma a esta inhibición.<sup>3,16</sup>

*P. aeruginosa* posee dos clases de  $\beta$ -lactamasas: Amp-C y las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Amp-C, está codificada en el cromosoma de la bacteria y tiene la capacidad de ser inducida por los propios  $\beta$ -lactámicos, especialmente cefalotina y ampicilina. Cuando esto sucede, hay resistencia a penicilinas y cefalosporinas (ceftazidime, cefepime); el grado de resistencia, depende del grado de represión de la Amp-C. El problema radica en que esta enzima, es inducida en cuestión de días por tanto, antes del tratamiento los  $\beta$ -lactámicos parecen servir, pero clínicamente el paciente no mejora y se descubre posteriormente la inducción completa de la enzima.

## 6.4 Metalo-betalactamasas(MBLs)

Las ( MBLs), pertenecen a la clase B de Ambler, y al grupo 3 de la clasificación de Bush *et al.* <sup>1</sup>, constituyen las carbapenemasas adquiridas de mayor relevancia clínica ya que tienen capacidad de hidrolizar a todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, excepto el aztreonam (AZT) . Quelantes como el EDTA inhiben el desarrollo de carbapenemasas. Existen dos tipos dominantes de MBLs, IMP y VIM, cada uno con múltiples variantes alélicas <sup>25</sup>. Las enzimas tipo IMP fueron descritas inicialmente en Japón en 1991 y han sido comunicadas frecuentemente en enterobacterias y bacterias gram-negativas no fermentadoras <sup>3</sup>, mientras que las VIM fueron detectadas originalmente en Europa en 1999, y han sido descritas fundamentalmente en *P. aeruginosa* y otros no fermentadores <sup>7</sup>. La enzima SPM-1, descrita en 1997, y la GIM-1 son también MBLs, cuyas secuencias difieren significativamente de las enzimas tipo IMP y VIM <sup>25</sup>. Recientemente se ha reportado una nueva MBL denominada SIM-1 (8). Prácticamente todos los genes codificantes conocidos de las enzimas tipo IMP y VIM, así como GIM-1, se encuentran como genes en *cassetes* localizados en integrones de clase 1, asociados a genes codificantes de enzimas modificadoras de aminoglucósidos <sup>1</sup>. Aunque pueden localizarse en integrones de clase 3 <sup>1</sup>. Los integrones tienen la capacidad de reclutar genes en *cassetes* por un mecanismo de recombinación sitio específico entre un elemento de 59 pares de bases en el gen en *cassetes* y el sitio *attI1* en el integrón <sup>1</sup>. Si bien los genes en *cassetes* tienen la posibilidad de desplazarse de un integrón a otro, estos últimos no son un sistema eficiente de transferencia entre bacterias y por lo tanto no es inusual su inclusión dentro de otros elementos como transposones o plásmidos.

## 7.0 Antibióticos

Un antibiótico es un compuesto producido por un microorganismo, que es capaz de inhibir el crecimiento de otro u otros microorganismos; por lo cual se le denomina agente antimicrobiano. Un agente antimicrobiano es una droga que actúa contra microorganismos infecciosos y cada antimicrobiano difiere en cuanto a su mecanismo de acción. Existen diferentes mecanismos de acción de los antibióticos, actúan a nivel de inhibición de síntesis de la pared celular bacteriana, inhibidor de B-lactamasas, inhibición de síntesis de proteína bacteriana mediante el bloqueo de la formación del complejo de iniciación, se fija al complejo 30<sup>S</sup>.<sup>11</sup>

### 7.1 Resistencia antimicrobiana

Muchas bacterias presentan resistencia a los agentes antimicrobianos y los patrones de resistencia cambian constantemente. Como no puede predecirse la susceptibilidad de las bacterias, con frecuencia es necesario estudiar la sensibilidad individualmente de cada agente a estas drogas, pudiéndose elegir entonces el agente apropiado (el más activo contra el patógeno, el menos tóxico con las características farmacológicas apropiadas y el más económico), que proporcione mayores posibilidades de una evolución favorable. Con este fin se desarrolló el antibiograma que trata de reproducir *in vitro* la susceptibilidad en la que se encuentra el microorganismo infectante en el humano, para determinar su posible sensibilidad a los antibióticos. Para evaluar la sensibilidad se enfrenta al microorganismo con distintas concentraciones de antimicrobianos en condiciones estándar. Las diferentes técnicas emplean los antimicrobianos incorporándolos a medios de cultivo líquidos o sólidos (técnicas de dilución) o la difusión del antimicrobiano contenido en un disco de papel de filtro en un medio sólido (técnica de difusión).<sup>11</sup>

## **7.2 Métodos de difusión en disco**

Es un método muy utilizado en la clínica; su fundamento es sencillo, se inocula un agar nutritivo y sobre su superficie se aplican discos de papel impregnados con antimicrobiano. Tras un periodo de incubación se obtiene alrededor del disco una zona de inhibición de crecimiento y el diámetro de la zona determina el grado de susceptibilidad del microorganismo al antimicrobiano.

Difusión radial del antibiótico, el cual inhibe el crecimiento del microorganismo que dependiendo del halo de inhibición y de acuerdo a las tablas de CLSI puede ser sensible o resistente.<sup>14</sup>

## **7.3 Concentración inhibitoria Mínima (CIM)**

Definimos CIM como la mínima concentración de antibiótico que inhibe el desarrollo de una bacteria.

A continuación se describe la forma en la que se realiza el procedimiento para los antibióticos.

## **7.4 Métodos de Concentración inhibitoria mínima por la técnica de dilución en caldo o agar**

La dilución es el método cuantitativo de referencia para la evaluación de la susceptibilidad de los microorganismos. Su fundamento es la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones creciente del antimicrobiano que se encuentra diluido en el medio de cultivo.

Inicialmente se utilizaron medios de cultivo líquidos (caldo) y posteriormente al describirse un sistema de inóculo múltiple para la superficie de placas de agar (inoculador de Steers), se popularizó el método en medio sólido. Los resultados obtenidos permiten clasificar a los microorganismos como sensibles, moderadamente sensibles (intermedios) y resistentes. El método de dilución más utilizado es la CIM.<sup>14</sup>

## 7.5 Lectura interpretativa del antibiograma

La importancia del antibiograma en el manejo de infecciones intrahospitalarias causadas por *P. aeruginosa* sobrepasa el simple deseo de saber a qué antibióticos es susceptible el aislamiento. Un concepto relativamente nuevo se impone en este sentido; consiste en la lectura interpretativa del antibiograma. Si se hace una apropiada identificación del género y especie de la bacteria y se selecciona un adecuado perfil de antibióticos en el antibiograma, es posible inferir a partir del mismo, los mecanismos de resistencia subyacentes en un aislamiento particular. Lo anterior permite no sólo orientar el tratamiento antibiótico, sino predecir cuales antibióticos no serían apropiados, teniendo en cuenta el mecanismo subyacente más probable. Otra ventaja es poder indicar antibióticos que se sabe no son substratos de los mecanismos de resistencia que se sospechan.<sup>29</sup> Estos mecanismos deberían ser confirmados por técnicas de tipificación molecular, para acercarnos de una manera más fiable al perfil genético de los aislamientos, analizar cómo se están transmitiendo y perpetuando dichos mecanismos y tomar medidas adecuadas que impidan la diseminación de la resistencia.<sup>25</sup>

## **8.0 Electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE)**

La PFGE ha sido aplicada con muy buenos resultados para esclarecer la identidad de aislamientos de cepas de posibles clonas que pueden estar relacionadas con un brote epidemiológicos en un hospital o comunidad. PFGE se utiliza para identificar una gama amplia de especies bacterianas relacionadas de microorganismos patógenos multiresistentes. PFGE implica la incorporación del DNA al gel de agarosa a través de la lisis , digerir con enzimas endonucleasas de restricción específicas para cortes, el gel agarosa que contiene los fragmentos de DNA cromosómico se inserta en los pozos de agarosa, los fragmentos de restricción, se resuelven en patrones de bandas discretas de acuerdo a su peso molecular en el gel en un equipo que cambia la dirección, de acuerdo al patrón predeterminado del DNA, patrones de restricción de los aislados se comparan entre sí para comparar su relación con el brote o con otras cepas, este estudio nos es útil para comprender la propagación de la enfermedad en hospitales y comunidades. Idealmente los patrones PFGE de cepas representan a la cepa del brote se distinguen unos de otros y claramente de las cepas relacionadas con el brote. PFGE es válido si se resuelven por lo menos 10 fragmentos. <sup>8</sup>

La interpretación plantea un conjunto de directrices en la interpretación de patrones de restricción de DNA por PFGE, con los datos obtenidos podemos correlacionar los datos epidemiológicos de docenas de brotes de cepas testigo con los resultados por PFGE.

Definiciones:

Aislamiento.

Es un término general para cultivo puro de las bacterias obtenido de una placa de aislamiento donde deriva un único organismo por lo que se dispone de información al margen de su género y especie.

Epidemiológicamente relacionado con los aislamientos.

Estos aislamientos de especies recolectados de pacientes y fómites del medio ambiente que duran un tiempo corto de una zona definida como parte de una investigación epidemiológica sugieren que el aislado puede derivarse de una fuente común. <sup>8</sup>



Cepas relacionadas genéticamente (Clones).

Son aislados que son indistinguibles unos de otros por una variedad de pruebas genéticas como (PFGE), electroforesis de enzimas o ribotipos) que dan un patrón común teniendo en cuenta el potencial de los cambios genéticos sobre la secuencia del DNA u otros análisis específicos, las pruebas de DNA son la mejores pruebas absolutas para confirmar la relación clonal.

Brote de cepa

Son aislados de la misma especie pueden ser ambas epidemiológicamente relacionadas por tiempo, lugar y una superficie común de infección.

Cepa endémica

Son aislados que se recuperan con frecuencia de pacientes infectados en un establecimiento de atención a la salud o de la comunidad y que son indistinguibles o estrechamente relacionados entre ambos.

Suposiciones sobre típicos brotes de cepas.

El objeto de estudio de cepas es para proporcionar al laboratorio evidencia relacionada epidemiológicamente de los aislados de un brote.

Criterios de interpretación.

La interpretación de fragmentos de DNA de las cepas generalmente por PFGE y la identificación es comúnmente utilizada en en uso epidemiológico la información del comparar patrones de PFGE y cómo los eventos aleatorios genéticos, pueden alterar los patrones en la interpretación. Idealmente los patrones de PFGE de cepas que representan a la cepa del brote se distinguen unos de otros y claramente diferentes de las de las cepas no relacionadas epidemiológicamente. Cuando esto ocurre el brote de la cepa es fácil de identificar <sup>2</sup>. Más comúnmente eventos genéticos aleatorios Incluyendo mutaciones puntuales, las inserciones y deleciones de DNA. Hacen la interpretación más difícil el conocimiento de cómo tales eventos genéticos afectan la interpretación permite que la interpretación asigne correctamente las características de cada cepa. <sup>8</sup>

## **Análisis (de restricción) de patrones asignados de aislados de ciertas categorías.**

Examinamos los patrones de identificación en los brotes los cuales suponemos representan cepas incompletas, no hay una muestra única y es probable que no estén relacionados, algunos patrones son aislados diferentes se identifican los patrones de los brotes en número de bandas y son comparados con las bandas analizadas.<sup>8</sup>

### **Controles**

La buena caracterización del control de cepas debería ser procedente junto con una prueba de patrón desconocido La obtención de la cepa de control indica que el, procedimiento, incluya la lisis celular, lavado, y la digestión con endonucleasas. A nivel molecular el tamaño debe ser ejecutado en al menos un carril del gel para proporcionar orientaciones tamaño de los fragmentos. ( a menudo es útil para ejecutar los estándares en un carril de fuera y en un carril en el centro del gel.) Los estándares son necesarios para evaluar el perfil de las diferencias menores que pueden derivarse de alteraciones genéticas, tales como supresiones, inserciones, mutaciones. El tamaño molecular de los fragmentos desconocidos se puede determinar trazando la distancia de la migración (en milímetros desde la parte inferior de la muestra así en el gel) del estándar en contra de la 10g de tamaño molecular de los fragmentos. Este gel se puede utilizar para convertir la migración a distancia de la banda en las muestras de ensayo a tamaño molecular. Fragmento de los tamaños son adecuados para la interpretación de PFGE. Preparados de fagos lambda a que se refiere como un "Lambda escalera", son comúnmente utilizados como los estándares de tamaño molecular, y algunos vendedores ofrecen preparaciones que contienen un mayor de 48 Kb, el cual es útil para el tamaño de orientación en el gel. Las demás preparaciones que contienen fragmentos de tamaño conocido, como tapones de agarosa que contiene restricción endonuclenasas clase 1. Digeridos de DNA de *Sacharomyces cerevisiae*, también son disponibles comercialmente, pero no son necesarios para determinar los tamaños de bandas obtenidos en la mayoría de PFGE cepas de protocolos típicas. El DNA del fragmento de restricción de varios patrones bien caracterizado organismos. en los que el tamaño de cada fragmento

cromosómico se ha determinado. Estos patrones deben incluir *S. aureus* ATCC 8325, *E. faecium* (ATCC 51558), *E. coli* MG1655 (ATCC 47076), y *E. faecalis* OG1RF (ATCC 47077). La inclusión de una de estas cepas en cada grupo de cepas que se ofrece tanto a prueba un procedimiento de control y un estándar de tamaño molecular.<sup>8</sup>

Cuando un conjunto de cepas sospechosas puede ser parte de un brote, es útil para incluir una muestra no vinculada epidemiológicamente con aislados así como para garantizar que las cepas endémicas pueden ser diferentes brotes de las cepas. Esto es particularmente importante para el análisis de brotes de meticilino-resistente *S. aureus* en la que el numero patrones de PFGE es limitado.<sup>8</sup>

## **9.0 HIPOTESIS**

Si la multirresistencia de *P. aeruginosa* se está incrementando entonces al adquirir metalo-betalactamasa aumenta su resistencia a carbapenems por lo que para un mejor tratamiento se necesita establecer la frecuencia la frecuencia de los aislamientos

## **10. OBJETIVOS**

Establecer la frecuencia de *P. aeruginosa* de origen nosocomial productoras de metalo-betalactamasa, aisladas durante el periodo de julio de 2008 a diciembre de 2009 en el Hospital Infantil de México Federico Gómez.

### **10.1 OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1.- Analizar el perfil de susceptibilidad de *Pseudomona aeruginosa* aislada de procesos infecciosos de origen nosocomial en el periodo establecido en niños de un día de nacido a 18 años de edad.
- 2.-Identificar las cepas de *P. aeruginosas* productoras de metalo-betalactamasas mediante la técnica de difusión en doble disco.
- 3.-Establecer la diversidad clonal de los aislamientos por macrorestricción mediante técnica de campos pulsados(PFGE)

## **10.2 Muestra**

Cepas de *P. aeruginosa* aislados de pacientes pediátricos entre un día de nacido y 18 años que permanecen por alguna causa hospitalizados y desarrollen una infección 72 horas después de su ingreso, sin privia hospitalización.

## **10.3 Criterios de inclusión**

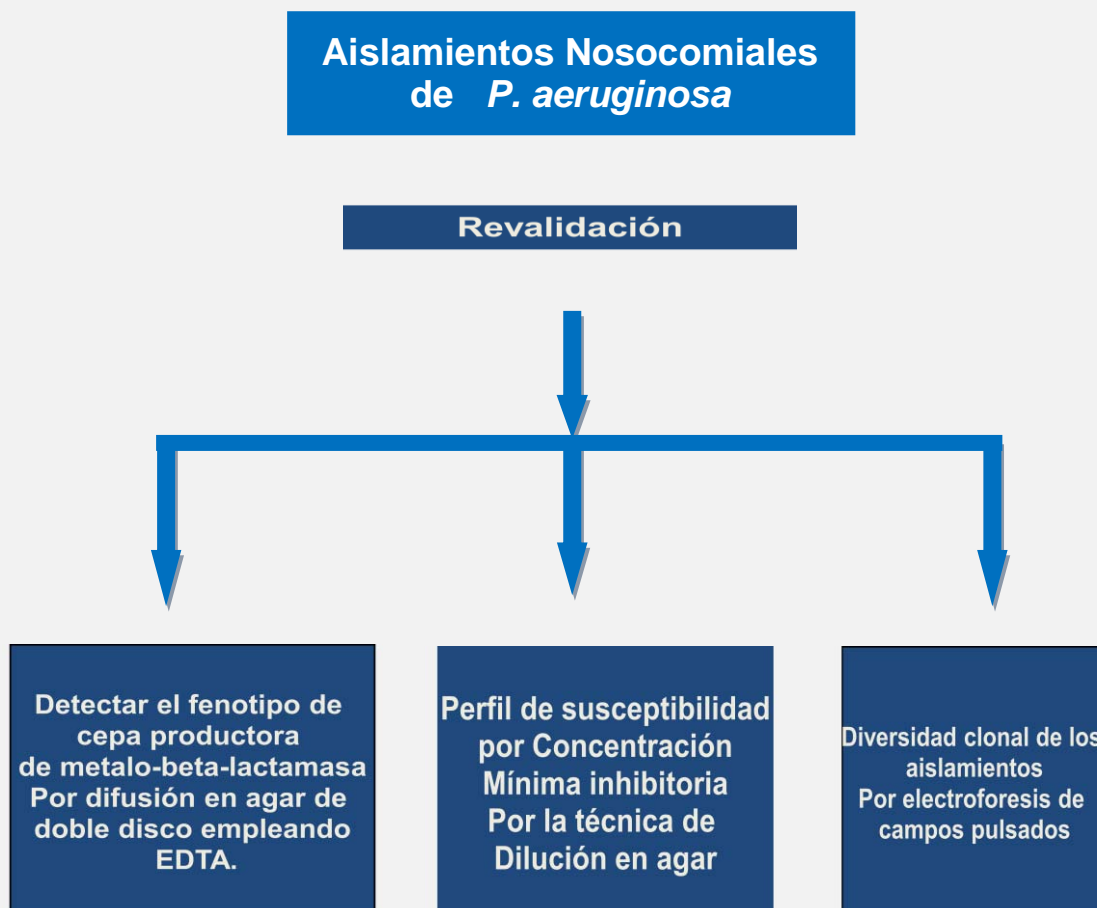
Todos las cepas de *P.aeruginosas* aislados de procesos infecciosos nosocomiales durante el periodo establecido y que estén conservadas en el cepario del HIMFG

## 11.0 MATERIALES Y METODOS

### 11.1 Cepas

Cepas identificadas como bacilos gram-negativos no fermentadores que proceden de aislamientos nosocomiales de pacientes pediátricos de Hospital Infantil de México Federico Gómez. Cepa ATCC 27853 de *Pseudomona aeruginosa*.

### DIAGRAMA DE FLUJO



## **11.2 Revalidación**

Buscar en el banco de cepas los bacilos identificados como no fermentados y resembrar en agar sangre, incubar a 37° C por 18 a 24 h.

De las cajas con crecimiento seleccionar una colonia y sembrar en agar soya tripticasa por estría cruzada para obtener un crecimiento masivo y puro que permita realizar las pruebas completarias a la identificación y la susceptibilidad antibiótica. Ver (anexo)

## **11.3 Perfil de susceptibilidad por Concentración Mínima Inhibitoria por la técnica de dilución en agar.**

Determinar el perfil de susceptibilidad con el empleo 10 diferentes antibióticos, mediante el método de dilución en placa recomendado por CLSI para *P. aeruginosa*, empleando diluciones seriadas 1:2 con cada antibiótico partiendo de una concentración 1280 ug/ml (ver anexo)

## **12 Detección fenotípica de metalobetalactamasa por difusión en agar de doble disco empleando EDTA**

Inocular en agar Mueller-Hinton masivamente con la suspensión bacteriana ajustada a 0.5 del nefelómetro de Mcfarlan y colocar un disco de papelfiltro inoculado con 10 ul de EDTA(0.025mmol) y discos comerciales de imipenem y meropenem, a 15 mm de distancia de centro a centro sin EDTA y dos discos más de imipenem y meropenem a los cuales se les aplico 10 ul de EDTA. El aumento del halo en la zona de los discos contenido EDTA fue interpretado como presencia de metalo- betalactamasa. ( Ver anexo)

### **13 Diversidad clonal de los aislamientos por electroforesis de campos pulsados (PFGE).**

De la suspensión bacteriana ajustada al 0.5 de la concentración de Macfarlan se realizo lavados con solución salina EDTA, decantar agregar 1ml de sol PIV, colocar en bloques de gel agarosa de bajo punto de fusión, agregar sol. de lisis decantar agregar sol de EDTA, incubar a 50<sup>0</sup>C hacer tres lavados con regulador, decantar y hacer cortes del gel agarosa de un cuarto en incubar a temperatura ambiente por 20 minutos, colocar en otro recipiente de plástico y lavar con solución reguladora, decantar y agregar enzima SpeI durante 30 minutos se obtendrán fragmentos 20 a 40 Kb se correrán a 9 volts a 14<sup>0</sup> C/30 horas 11 minutos, se realiza el corrimiento el equipo de campos pulsados.



## 14. RESULTADOS

### FRECUENCIA DE LOS AISLAMIENTOS

La edad promedio en niños fue de 5 años y en niñas de 9 años. La mayor frecuencia de aislamientos es del 15% y corresponde a la unidad de Terapia Intensiva seguida de la unidad de Cirugía,( 7%), Nefrología (5%), que son aéreas en las cuales no existe una normatividad de los procedimientos en la instalación de sondas urinarias y manejo de catéteres venosos, centrales , procedimientos de intubación, manejo de múltiples soluciones y cirugías, además del estado inmunocomprometido del paciente, esto lleva a infecciones, bacteriemias y septicemias ocasionadas por *Pseudomonas aeruginosa* y otros microorganismos patógenos.

Son factores de riesgo esperado de acuerdo al hospital y reportado en otros hospitales.

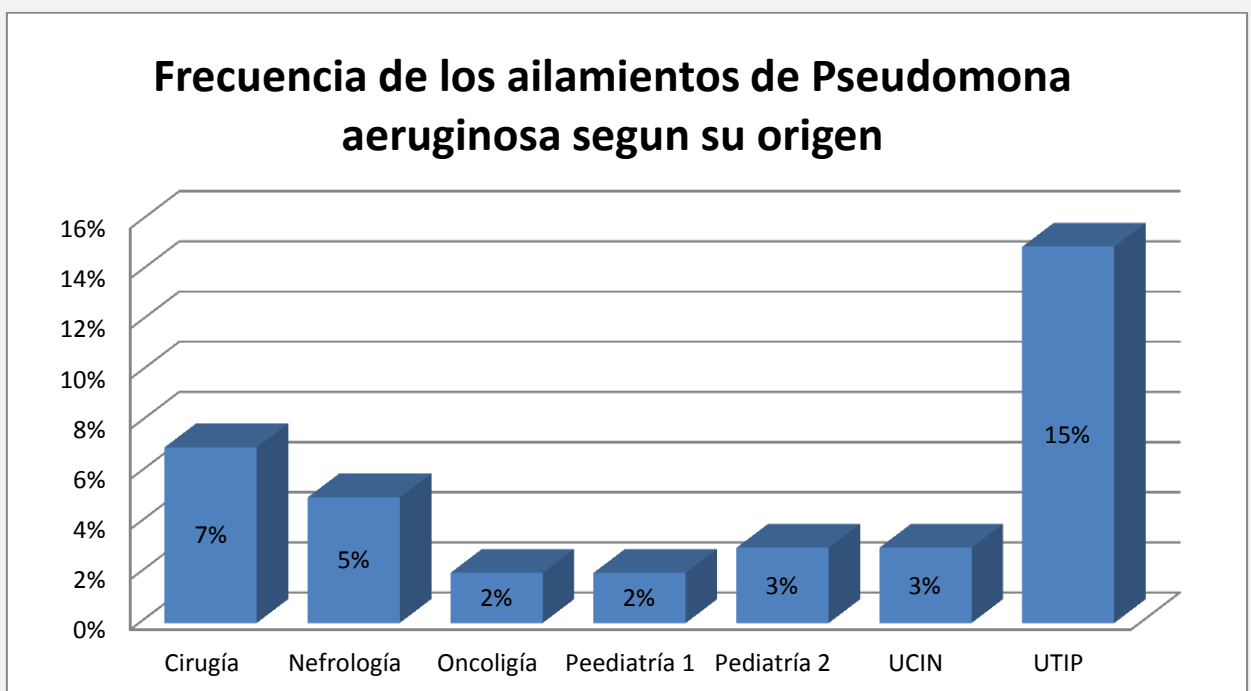


Fig. 3. Frecuencia de aislamientos de *P.aeruginosa* según el sitio de aislamiento

## RESULTADOS DE SENSIBILIDADES

Los resultados muestran que los antibióticos más efectivos son los del grupo de las Quinolinas (Levofloxacino, Ciprofloxacino), Cefalosporinas (Cefepime, Ceftazidima), Carbapenémicos (Imepenem, Meropenem), Monobactámicos (Aztreonam), quienes presentan un promedio de 60% de sensibilidad por lo que se les considera de buena elección en el tratamiento de la enfermedad.

Con respecto al grupo de los aminoglucosidos, la Amikacina observamos que no es un antibiótico de elección debido a su alta resistencia (42.2%) y baja sensibilidad (34.6%).

Veinte por ciento de los aislamientos son mutiresistentes, por presentar resistencia a la mayoría de las familias de antibióticos (fig. 4), cefepime, es una buena opción terapéutica en más de 40% de los aislamientos, 34% y 26% de los aislamientos fueron resistentes a carbapenémicos (imipenem y meropenem).

La resistencia mostrada a los carbapenémicos fue mayor en un 25%, con respecto a datos de años anteriores del HIMFG que se reportó que la sensibilidad a carbapenémicos fue del 80%.

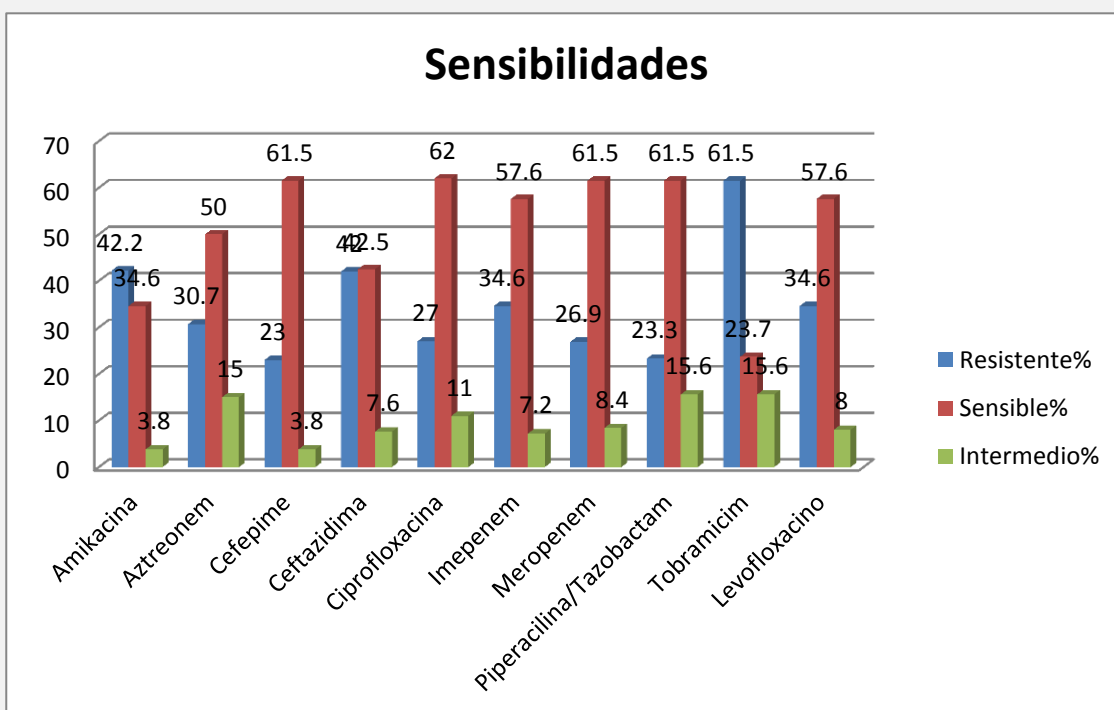


Fig. 4. Perfil de susceptibilidad de *P. aeruginosa* de origen nosocomial del periodo de periodo de 1 de julio de 2008 a julio de 2009 en el HIMFG

## Frecuencia de metalo-betalactamasas en los aislamientos nosocomiales

Con respecto a las cepas multiresistentes se determino que el 11 % posee metalo-betalactamasa lo que indica un incremento en la resistencia a carbapenems en un 25%, con respecto a datos de años anteriores del HIMFG que demuestran que la sensibilidad a carbapenems era del 80%.

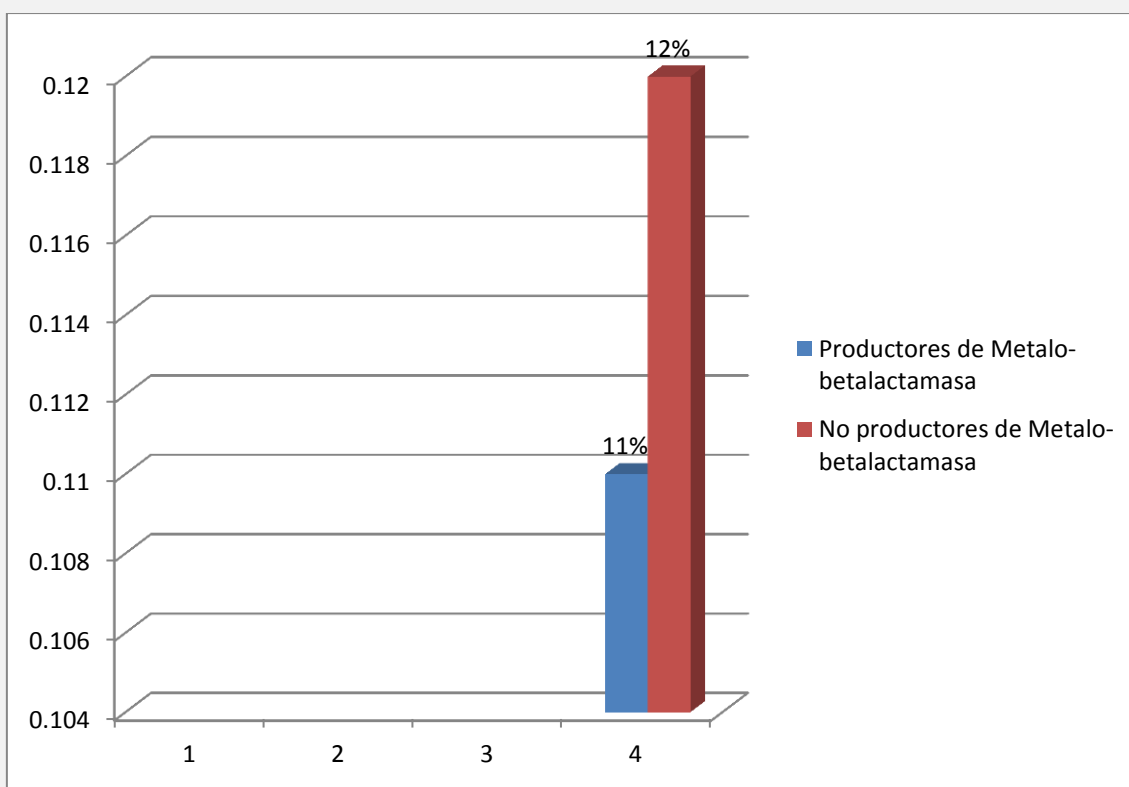


Fig. 5 Frecuencia de metalo-betalactamasas en los aislamientos nosocomiales de *P.aeruginosa*.

## RESULTADOS DE ELECTROFEROGRAMA

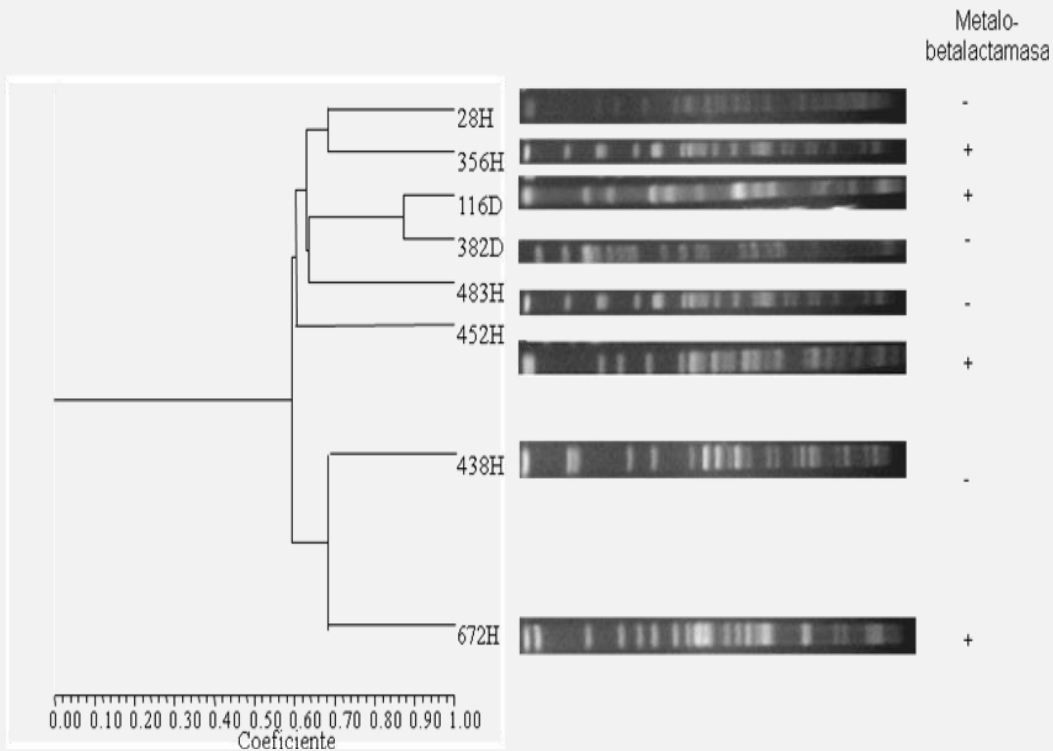


FIGURA 6 Arbol filogenetico.

Electroferograma de la macrorestricción con enzima *SpeI* de *P. aeruginosa* de origen nosocomial

El analisis de bandas nos muestra que ninguna cepa es igual a las demas todas presentan diferente número de bandas.

No observamos la presencia de ningun evento genetico que modificara el numero de bandas como son las inserciones o deleciones que nos indicaran que se trata de una misma cepa. Observamos que se presenta un analisis de similitud entre el 60% y 86%, lo que indica que se trata de cepas diferentes, aisladas en diferentes eventos, mediante este analisis podemos observar que no se trata de ningun brote, no hay diseminación de la cepa hacia otras áreas.

Las cepas 28H y 356H corresponden a un análisis de similitud del 68%, lo que indica que se trata de cepas diferentes en comparación con las demás. La cepa 28H corresponde a un paciente internado en el servicio de pediatría y permaneció por un periodo de 12 días, no adquirió MBLs; el paciente respondió a los antibióticos administrados y egresó. La cepa 356H que fue aislada de un paciente internado del servicio de UTIP y permaneció por un periodo de 75

días, adquirió MBLs incrementando su resistencia por lo que el paciente fallece. Las cepas 116D Y 382D corresponden a un análisis de similitud del 86% lo que indica que se trata de cepas diferentes en comparación con las demás.

La cepa 116D corresponde a un paciente internado en el servicio de UTIP permaneció por un periodo de 51 días adquirió MBLs incrementando su resistencia, no responde a los tratamientos y el paciente fallece. La cepa 382D corresponde a un paciente internado en el servicio nefrología y permanece un periodo de 52 días, no adquirió la MBLs responde a los tratamientos y egresa. La cepa 483D presenta un análisis de similitud del 62% lo que muestra que se trata de una cepa diferente en comparación con las demás, este paciente permaneció internado en el servicio de cirugía por un periodo de 31 días, no adquirió MBLs responde a los tratamientos y egresó.

La cepa 452H presento un análisis de similitud del 60% lo que indica que se trata de una cepa diferente en comparación con las demás este paciente permaneció internado en el servicio de UCIN por un periodo de 32 días y adquirió MBLs aumentando su resistencia a los antibióticos, el paciente fallece.

La cepas 438H corresponden a un paciente que presentan un análisis de similitud del 68% lo que indica que se trata de una cepa diferente en comparación con las demás este paciente permaneció internado en el servicio de pediatría por un periodo de 33 días y no adquirió MBLs respondiendo a los tratamientos antimicrobianos, el paciente egresó.

La cepa 672H presentó un análisis de similitud del 69% es diferente en comparación con las demás el paciente permaneció por un periodo de 21 días no presento me MBLs y egresó.

## 15. DISCUSIÓN.

En la última década se ha observado un aumento en la resistencia mostrada a carbapenems de un 20% a nivel mundial estos antibióticos controlaban con gran eficiencia la mayoría de las infecciones bacterianas por *P. aeruginosa* aún en pacientes inmunodeprimidos o inmunosuprimidos.

La sensibilidad de las bacterias a los antimicrobianos varía como consecuencia de la aparición de resistencias y la posterior selección de las cepas que las expresan. Esta resistencia puede ser originada por diversos factores como son la incapacidad del antibiótico para atravesar la pared celular, o la producción, por parte de la bacteria, de una enzima que inactiva el antimicrobiano.

La resistencia al antibiótico puede ser también innata a todos los miembros de una especie. *P. aeruginosa* es un patógeno que presenta resistencia a diversos agentes antimicrobianos. Inicialmente se pensó que esta resistencia intrínseca era debida al hecho que esta bacteria posee una membrana externa es insuficiente para explicar la elevada resistencia intrínseca que presenta esta bacteria, en general existen tres mecanismos por la que *P. aeruginosa* es multiresistente uno es el sistema del flujo que es la bomba Mex-AB-oprM que esta expresada de manera constitutiva y juega un papel importante en la resistencia intrínseca a muchos beta-lactámicos, fluoroquinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol, novobiocina, macrólidos, trimetoprim, sulfamidas, así como algunos colorantes y detergentes. También ha sido demostrado que el sistema MexXY-OprM está relacionando con la resistencia intrínseca a numerosos agentes como la tetraciclina, eritromicina y la gentamicina, así como fluoroquinolonas y aminoglucósidos.

La aparición de nuevos antimicrobianos ha hecho aumentar el grado de resistencia de esta especie a los antibióticos. la adquisición de resistencia nuevos antibióticos se atribuye a una mutación cromosómica, a la expresión inducida de un gen cromosómico latente o por el intercambio de material genético a través de estructuras genéticas móviles como son los plásmidos, los transposones y los integrones.

Las mutaciones más importantes que causan resistencia a diversos antimicrobianos en *P. aeruginosa* son:

1. Mutaciones en el gen *gyA*, que causa una alteración de la subunidad A de la DNA girasa y, mutaciones en los genes de las topoisomerasas II y IV. Estas mutaciones confieren resistencia a quinolonas.
2. Mutaciones que provocan depresión de la expresión de la *B*-lactamasa AmpC, debido a una mutación en el gen *ampD*. Como consecuencia, disminuye la susceptibilidad a penicilinas y cefalosporinas.
3. Aumento de la expresión de sistemas de reflujo constitutivos como el Mex-AB-OprM (mutación en el gen *nalB*) que confiere resistencia a las fluoroquinolonas, penicilinas, cefalosporinas y al meropenem.
- 4.-Alta regulación de otros sistemas como MexCD-Oprj (mutación en el gen *nfxB*) y MexEF-OprN (mutación en el gen *nfxC*), que se expresa únicamente en mutantes y que en hacerlo confieren resistencia a algunas fluoroquinolonas y *B*-lactámicos.
- 5.- Mutaciones que alteran la permeabilidad de la membrana, como es el caso de la mutación en el gen *oprD*, que provoca la pérdida de la porina OprD de manera que confiere resistencia al imipenem y disminuye la susceptibilidad al meropenem.

El imipenem, tiene la particularidad de presentar un núcleo carbapenem que lo hace resistente a la acción de las *B*-lactamasas en general, con excepción de las metalo-*B*-lactamasas (enzimas capaces de hidrolizar carbapenems). Su acción es posible debido a que puede atravesar la membrana externa a través de las porinas, que en el caso de *P. aeruginosa* es la OprD. *P. aeruginosa* posee metalo-*B*-lactamasas, pero el mecanismo principal de resistencia al imipenem es la pérdida de la porina OprD. En este estudio encontramos que los carbapenems son antibióticos de buena elección en el tratamiento de la infección.

La Ceftacidima, una cefalosporina de tercera generación, presenta una actividad invitro contra *P. aeruginosa* mayor que cualquier otra cefalosporina, sin embargo encontramos unas frecuencias de resistencia probablemente debido a una mutación que provoca una depresión de la *B*-lactamasa cromosómica.

Los aminoglucósidos inhiben la síntesis de proteínas. La tobramicina, a diferencia de los primeros aminoglucósidos como la amikacina se unen tanto a la subunidad 30S como a la de 50S del ribosoma para llevar a cabo esta inhibición. Esto hace que se requiera más de una mutación para la adquisición de resistencia en nuestros resultados observamos que no son de buena elección para el tratamiento de la enfermedad.

El grupo de las quinolonas, a la que pertenecen la ciprofloxacina, actúa inhibiendo la síntesis del DNA mediante el bloqueo de la DNA girasa o la Topoisomerasa IV. Las quinolonas de nueva generación tienen la capacidad de unirse a varias dianas de las subunidades girasa, lo que dificulta la aparición de las cepas resistentes en este estudio encontramos un 57.6% de sensibilidad y un 34.6 de resistencia lo que indica que es un tratamiento de selección.

En general observamos que la mayoría de los antibióticos usados son de buena elección en el tratamiento de la infección ocasionada por *P.aeruginosa*.

La resistencia bacteriana puede ser innata a la bacteria o puede darse por la presión selectiva mediada por antibióticos, de modo que la frecuencia de microorganismos resistentes es directamente proporcional al grado en el cual los fármacos son empleados en cierta área poblacional y al período de tiempo en el que son empleados.

### **Frecuencia de los aislamientos.**

*Pseudomonas aeruginosa* es esencialmente un agente patógeno intrahospitalario con alta letalidad. Entre los principales factores de riesgo asociados a muerte están: sepsis grave, neumonía, retardo en el inicio de terapia antimicrobiana efectiva entre otras. *Pseudomonas aeruginosa* es esencialmente un patógeno intrahospitalario, con alta letalidad. La mortalidad asociada a bacteriemias por *P. aeruginosa* varía de 33 a 61%,<sup>4</sup> es una de las bacterias *gram-negativas* más comúnmente aisladas en infecciones nosocomiales, especialmente en Unidades de Cuidado Intensivo (UCI); la incidencia de infecciones por *P. aeruginosa* en otros hospitales del país es de 0.4% de los egresos totales y provoca 10.1% de todas las infecciones nosocomiales.



Siendo el agente etiológico en 21% de las neumonías, 10% en infecciones del tracto urinario, 8% en infecciones postquirúrgicas y 3% en bacteriemias; en UCI es la segunda causa de infección nosocomial, causando 30% de neumonías, 19% de infecciones urinarias y 10% de bacteriemias.<sup>6</sup> En México se reporta dentro de los cinco primeros lugares en la etiología de infecciones nosocomiales.<sup>9</sup> Nuestros resultados obtenidos, los principales lugares de aislamientos corresponden al área de unidad de terapia intensiva en un 15% primera causa de infección nosocomial y bacteriemia, en segundo lugar corresponde al área de cirugía 7% seguido de nefrología, 5%, UCIN 3%, pediatría 2% y oncología 2%. Estos datos son los esperados y corresponden asimismo, a otros hospitales, esto indica un mal manejo de sondas y catéteres por parte del área médica y de enfermería por lo que es importante se implemente o modifique las medidas de seguridad e impedir la propagación de esta cepa multirresistente causante de septicemias.

### **Frecuencia de metalo-betalactamasa**

La prevalencia de aislamientos de *P. aeruginosa* productores de MBLs en el HIMG " fue de 11%, y éstos fueron recuperados en su mayoría de pacientes internados en la unidad de cuidados intensivos. Debido a que adquirieron MBLs, por otras enterobacterias, incrementando la resistencia y mortalidad de los pacientes hospitalizados. Mediante la técnica realizada se logró incrementar las detecciones de MBLs, que presentaron halos de inhibición correspondientes al punto de corte sugerido.<sup>28</sup>

## **Analisis del electroferograma**

El objetivo final de las técnicas de epidemiología molecular aplicada al análisis de brotes de infección, es poner de manifiesto que los aislamientos relacionados epidemiológicamente, lo están genéticamente. Es impredecible conocer el fundamento de la técnica de PFGE y cómo ciertos cambios genéticos pueden alterar los patrones de bandas obtenidos por PFGE, para interpretar correctamente los resultados. En una situación ideal los patrones de PFGE de los aislamientos que representan una cepa epidémica deberían ser idénticos y fácilmente diferenciables de los aislamientos epidemiológicamente no relacionados. Sin embargo con frecuencia cambios genéticos, que ocurren de forma aleatoria alteran el perfil de los patrones de la cepa epidémica en el curso de un brote. A pesar de todo, la comparación de los patrones de restricción tiene un importante componente.

Este análisis se realiza observo la presencia o ausencia de bandas de acuerdo a su peso molecular y mediante el programa NTSYS que se utiliza para su agrupación de acuerdo al número de bandas que encontramos. Se identifico dos ramas importantes donde distinguimos la presencia de 5 grupos y 8 perfiles, observamos una similitud en número de bandas entre el 60% y 80% lo que indica que se trata de cepas diferentes aisladas en diferentes eventos, no observamos la presencia de eventos genéticos que modificaran el número de bandas como son la inserciones o deleciones que nos indicara que se trata de una misma cepa, observamos que las cepas aisladas en los diferentes servicios corresponde a diferentes cepas por lo que no se trata de una cepa única no hay diseminación de la cepa multirresistente hacia las atrás aéreas que ocasionara un brote, dentro del hospital.

## 16.0 CONCLUSIONES

La bacteriemia por *Pseudomona aeruginosa* tiene alta mortalidad y se presenta principalmente en pacientes inmunocomprometidos entre los principales factores asociados son la neutropenia, choque séptico, haber recibido terapia inapropiada. Los antibióticos más efectivos son los del grupo de las Quinolinas (Levofloxacino, Ciprofloxacino), Cefalosporinas (Cefepime, Ceftacidima), Carbapenémicos (Imepenen, Meropenem), Monobactámicos (Aztreonem), quienes presentan un promedio de 60% de sensibilidad por lo que se les considera de buena elección en el tratamiento de la enfermedad.

20% de las *P. aeruginosa* mostró multirresistencia, lo que impacta directamente en la morbilidad y mortalidad del paciente, así como mayor costo hospitalario.

11% de los aislamientos de *P. aeruginosa* nosocomiales presentaron metalo-betalactamasas lo que ocasiono mayor mortalidad en los pacientes hospitalizados. En cerca del 23% su resistencia a carbapenémicos esta mediado por otro mecanismo de resistencia.

PFGE es una técnica que nos permite observar el número real de bandas, en comparación con otras técnicas moleculares en este análisis, no observamos ningún evento genético como son las inserciones o deleciones que se manifestaran en el numero de bandas, el análisis de similitud nos indica que las cepas aisladas corresponden a diferentes cepas multirresistentes que adquirieron MBLs aumentando su resistencia a carbapenems, ocasionando que los pacientes que adquirieron esta enzima fallecieron.

Es importante mencionar que cada hospital debe constar con un comité de infecciones nosocomiales y que se otorgué cuidados especiales al paciente que se detecte con enfermedad potencialmente transmisible, el personal debe realizar los procedimientos necesarios conforme a normatividades establecidas, como es el lavado de manos, desinfectantes adecuados, esterilización, desinfección y mantenimiento de equipos, circuitos de ventiladores y humidificadores deben cambiarse cada 48 horas, para evitar diseminación de cepas multirresistentes hacia otras áreas.

## 17.0 BIBLIOGRAFIA

- 1.-Ambier R, Coulson A, Frere J, Ghuyssen J, Joris B, et al. A standar numbering scheme for the class AB-lactamases. *Biochem J.* 2005; 275: 269-272.
- 2.-Bertrand X, Thouverez M, Patry C, Balvay P, Talon D. *Pseudomonas aeruginosa*: antibiotic susceptibility and genotypic characterization of strains isolated in the intensive care unit. *Clinic Microbiol Infect* 2005; 7: 706-708.
- 3.- Poole K. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 479-487.
- 4.-Camacho O A. *Pseudomonas aeruginosa*, antimicrobial resistance in a feaching hospital of the north of Mexico. *Enf inf microbiol* 2007 27 (2): 44-48
- 5.- Cheol-In K, Sung-Han K, Hong-Bin K, Sang-Won P, Young-Ju Ch, Myoung-don O, et al. *Pseudomonas aeruginosa* bacteriemia: risk factors for mortality and influence of delayed receipt of effective antimicrobial therapy on clinical outcome. *Clin Infect Dis.* 2006; 37:745-51.
- 6.-CLSI. Performance Standars for Antimicrobial Susceptibility Testing. Informational supplement. CLSI document Wayne. PA. USA: National Committee for Clinical Laboratory Standars: 2006: 48, 49 77-85, 94, 95, 118-123, 127-133.
- 8.-Coria LJ. El uso del meropenem en el Hospital Infantil de México. *Revista de enfermedades infecciosas en Pediatría.* 2005; 15: 110-112.
- 9.-Cornejo-Juarez P, Velásquez-Acosta C, Díaz-González A, Volkow-Fernandez P. Trend of antimicrobial drug-susceptibility of blood isolates at an oncological center (1998- 2003). *Salud Pública Mex* 2005, 47: 288-293.

10.-Fred C. Tenover, Robert D. Arbeit, Richard. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. Rev. 2005; 101: 2233-2238.

11.-Giamarellou H. Prescribing guidelines for severe *Pseudomonas* infections. J Antimicrob Chemother.2005; 49:229-33

12.-Giwereman B, et al. Rapid emergence of resistance in *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients due to in-vivo selection of stable partially derepressed B-lactamase producing strains. J Antimicrob Chemother 2005;26:247-59

13.-Goossens H. Susceptibility of multi-drugs-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units: results from the European Mystic study group. Clin Microbiol Infec. 2005; 9: 980-983.

14.-Hancock RE, et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. Drug Res Updates 2005;3:247-55

15.-Henwood C. J., et al. Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*: Results of a survey and evaluation of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy disc susceptibility test. J Antimicrob Chemother 2005; 47:789-799

16.-Henwood C, Livermore D, James D et al. *Antimicrobial susceptibility of Pseudomonas aeruginosa: result of a UK survey and evaluation of the British Society of Antimicrobial Chemotherapy disc susceptibility test.* Journal of Antimicrob Chemother 2001; 47: 789-799.

17.-León Ramírez A. Casta Cruz M, Avila Figueroa C. Infecciones nosocomiales en el Hospital Infantil de México Federico Gomez, Enfermedades Infecciosas 2006; 16; 219-223.

18.-Katzung BG, Trevor AJ, Farmacobiología: Autoevaluación 10 ed. Mexico. Ed. El manual moderno, 2005: 481-449, 511-519, 531-538.

19.-Kriengkauykiat J, Porter E, Lomovskaya O, Wong-Beringer A. Use of an efflux pump inhibitor to determine the prevalence of efflux pump-mediated fluoroquinolone resistance and multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. 2006; 50:306-322.

20.- M. Bodí, J. Garnacho. *Pseudomonas aeruginosa*: combined treatment vs. monotherapy Med. Intensiva v.31 n.2 Madrid mar. 2007.

21.- Mendes R, Garcia P, Guzman M, Toleman M, Walsh T, Jones R. First Isolation of blaVIM-2 in Latin America: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 48: 1433-4.

22.-Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC. Manual of Clinical Microbiology. 14 ed Washinton , DC, USA; American Society for Microbiology Press 2005: 517-525.

23-Okeke IN, Klugman KP, Bhutta ZA, Duse AG, Jenkins P, O'Brien TF, Pablos-Mendez A, Laxminarayan R. Antimicrobial resistance in developing countries. Part II: strategies for containment. *Lancet Infect Dis* 2005, 5: 481-493.

24.-Pagniez G, Radice M, Gutkind G. Prevalencia de Metallo-B-Lactamasa en *Pseudomona aeruginosa* resistente a carbapenemas. 2006: 83;223-248.

25.-Perez I. Alfonso, Garcia C. Patricia, Poggi M, Helena et al. Presence of metal lo B-lactamases in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Rev Med. Chile, Apr. 2008, vol. 136, no.4, p.423-432. ISSN 0034-9887

26.-Renata Crsitina Picao. Metallo-B –Lactamasa Detection. Comparative Evaluation of Double-Disk Synergy versus Combined Disk Test for IMP, GIM, SIM, SPM, or VIM-producing isolates. 2008; 207: 100-145.

27.-Rossolini GM, et al. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Microbiol Infect 2005; 11 suppl 4:17-32

28.-Tamber S, Ochs M, Hancock. Role of novel OprD family of porins in nutrient uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol 2006, 188: 45-54.

29.-Timothy R. Walsh, Mark A. Toleman, Laurent Poirel. Metallo B-Lactamase: Quiet before the Storm. 2006; 67: 2755-2770.

30.-Vallis AJ, Yahr TL, Barbieri JT, Frank DW. Regulation of ExoS production and secretion by *Pseudomonas aeruginosa* in response to tissue culture conditions. Infect. Immun 2005; 67:914-920.

31.-Walsh T, Toleman M, Poirel L. Metallo-B-Lactamases. Clin Microbiol Rev. 2005, 306-325.

32. - Weingarten JA, Paterson DL, Yu VL. *Pneumonia caused by Pseudomonas aeruginosa*. Cur Treat Opt in Infec Dis 2006; 5: 159-169.

## 18.0 ANEXOS

### REVALIDACION

#### IDENTIFICACION DE BACILOS GRAM NEGATIVOS NO FERMENTADORES

<b>Prueba Mo.</b>	<b>Oxidasa</b>	<b>Citrato</b>	<b>Nitrato</b>	<b>Esculina</b>	<b>Indol</b>	<b>Urea</b>	<b>Gelatina</b>	<b>Arginina</b>	<b>Glucosa</b>	<b>Maltosa</b>	<b>Manitol</b>	<b>Xilosa</b>	<b>Manosa</b>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	-	-	+ 66%	+ 46%	+	+	-	+ 70%	+ 85%	+ 79%
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	+	-	-	-	+ 44%	+	+	+	+ 31%	+	+	+
<i>Pseudomonas putida</i>	+	+	-	-	-	+ 43%	-	+	+	-	-	+	+
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+ 70%	+	+ 89%
<i>Burkholderia cepacia</i>	+	+	+ 39%	+ 67%	-	+ 45%	+ 74%	-	+	+	+	+	+
<i>Swewanella putrefaciens</i>	+	-	+	+ 71%	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	+ 73%	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+ 75%
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	+	+ 37%	+	-	-	-	-	+	+	-	+ 35%	+
<i>Acinetobacter antitratus</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-
<i>Acinetobacter Iwoffii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Alcaligenes</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Flavobacterium</i>	+	-	-	+	+	-	+	NR	+	+	+	-	NR
<i>Ochromobacter anthropi</i>	+	+ 47%	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+ 70%

(-) Negativo, (+) Positivo y NR = No reportado



## 18.1 Tinción de gram

### Fundamento

Por medio de este método es posible dividir a las bacterias en dos grandes grupos: las bacterias gram- negativas y las gram- positivas.

Cuando se les tiñe con el colorante primario cristal violeta y se adiciona un mordente (soluciones débiles de yodo) con una posterior decoloración con alcohol-cetona, las bacterias gram positivas retendrán la coloración por más tiempo que las gram -negativas. Se atribuye esta diferencia al contenido lipídico mucho más elevado de la pared celular de las bacterias gram-positivas. El alcohol cetona elimina casi todos los lípidos de la pared celular de la bacteria gram-negativas rápidamente, liberando así el complejo yodo-tintura que se ha formado de manera que se consideran bacterias gram-positivas aquellas que resisten a la decoloración y por lo tanto conservan un tono azul o morado, mientras que se consideran gram-negativas las bacterias que no resisten la decoloración y por eso se observan de un tono rosado que adquiere por la safranina que es el colorante de contraste.

### Método:

Colocar una pequeña gota de agua sobre un portaobjetos.

Tomar una colonia y homogenizar con el agua.

Dejar secar y pasar sobre el mechero para secar.

Adicionar cristal violeta y se deja un minuto.

Enjuagar con agua caliente.

Adicionar lugol y dejar por un minuto.

Enjuagar con agua corriente.

Decolora con alcohol cetona.

Enjuagar con agua corriente.

Adicionar safranina y dejar por un minuto.

Enjuagar con agua corriente.

Dejar secar al aire.

Observar al microscopio a inmersión.

### Interpretación

Bacterias gram-positivas se observan color azul o morado.

Bacterias gram-negativas se observan color rosado.

## 18.2 Pruebas especiales

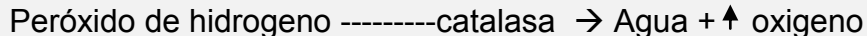
### Catalasa

Principio.

Comprobar la presencia de la enzima catalasa.

Bases Bioquímicas.

La enzima catalasa se encuentra en la mayoría de las bacterias aeróbicas y anaeróbicas facultativas que contienen citocromo. Por lo general, los organismos que no poseen el sistema citocromico carecen también de la enzima catalasa y por lo tanto no pueden descomponer el peróxido de hidrogeno, la mayoría de las bacterias anaerobias poseen la enzima peroxidasa. Anaerobias poseen la enzima peroxidasa en lugar de la catalasa. El peróxido de hidrogeno se forma como un producto terminal oxidativo de la descomposición aeróbica de los azucres, si se deja acumular, es toxico para las bacterias y provoca su muerte. La catalasa descompone el peróxido de hidrogeno y el pH optimo para su actividad es 7.



Método

Tomar con el asa de inoculación el centro de una colonia pura y colocarla sobre una porta objetos.

Adicionar una gota de peróxido de hidrogeno al 30% sobre el organismo.

Observar la inmediata formación de burbujas (liberación de gas).

Interpretación

Prueba positiva: formación inmediata de burbujas bien visibles (formación de oxigeno).

Prueba negativa no hay formación de burbujas.

Nota: esta prueba no debe hacerse en agar de sangre ya que los eritrocitos poseen la enzima catalasa y puede darse un falso positivo.

## **Oxidasa**

### Principio

Determinar la presencia de las enzimas oxidasas

### Pruebas Bioquímicas

La prueba de la oxidasa se basa en la producción bacteriana de una enzima oxidasa. Esta reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo reductasa del oxígeno molecular. Todas las bacterias aeróbicas obtienen su energía por la respiración, proceso responsable de la oxidación de diversos sustratos. El oxígeno molecular oxida un sustrato con la intervención del sistema de transporte de electrones. El sistema citocromo solo se encuentra por lo general en los organismos aerobios, lo que los hace capaces de utilizar el oxígeno como un aceptor de hidrógeno para reducir el oxígeno molecular en peróxido de hidrógeno. Algunas aseguran que la oxidasa positiva está limitada a aquellos organismos capaces de desarrollarse en oxígeno y producir al mismo tiempo la enzima catalasa.

### Método

Reactivo de Kovacs: papel filtro impregnado con diclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina al 1%

Tomar una tira de papel.

Común aplicador tomar el centro de la colonia y colocarlo sobre el papel.

Observar la presencia de color en un tiempo de 5 a 10 s.

### Interpretación

Oxidasa positiva: la parte donde se puso la colonia toma un color marrón y finalmente negro purpúreo

Oxidasa Negativa: no se produce cambio o solo adquiere un color rosa pálido por el reactivo.

La citocromo oxidasa, en presencia del oxígeno atmosférico, oxida el reactivo fenilendiamina oxidasa para formar un compuesto coloreado, el indofenol.

## 18.3 Pruebas bioquímicas

### Agar hierro kligler

#### Principio

Determinar la capacidad de un organismo de atacar un hidrato de carbono específico incorporado en un medio de crecimiento básico.

#### Bases bioquímicas

Un organismo puede usar diversos sustratos incorporados en el medio; los diferentes sustratos metabolizados son utilizados para diferenciar entre varios grupos, géneros y especies. Este medio contiene dos hidratos de carbón: lactosa, con concentración del 1% y glucosa en concentración del 0.1%. Algunos organismos tienen la facultad de fermentar ambos hidratos de carbono; otros fermentan solamente la glucosa; y otros aun, no son capaces de fermentar ninguno de los dos.

La fermentación se produce aeróbicamente (en el pico de la flauta) y anaeróbicamente (en el fondo de la flauta).

#### Medio utilizado

Agar hierro kligler, pH: 7.4

#### Ingredientes

Extracto de carne	3g
Extracto de levadura	3g
Peptona	15g
Proteosa peptona	5g
Lactosa	10g
Dextrosa (glucosa)	1g
Sulfato ferroso	0.2g
Cloruro de Sodio	5g
Tiosulfato de sodio	0.3g
Rojo de fenol	0.024g
Agar	12g
Agua destilada	1000 ml

### Método de preparación

Pesar la cantidad adecuada del medio comercial.

Rehidratar con agua destilada.

Calentar suavemente hasta su disolución.

Distribuir en tubos, aproximadamente 2ml.

Esterilizar con autoclave a 121° C, 15 lb, 15 min.

Dejar enfriar en posición inclinada.

### Inoculación

Tomar un cultivo puro e inocular en el pico de flauta en “cola de pescado” y por picadura en la capa profunda. Incubar a 35° C por 18 a 24 h.

### Interpretación

Fermentación de la glucosa: la capa profunda cambia de color a amarillo.

Fermentación de los dos carbohidratos: todo el tubo cambia a amarillo.

No fermenta ni la glucosa, ni la lactosa: sin cambio de color.

## Esculina

### Principio

Determinar la facultad de un organismo de hidrolizar el glucósido esculina en esculetina y glucosa.

### Bases Bioquímicas

La esculina es un glucósido (cuando un elemento que no es hidrato de carbón se une a una azúcar por medio de un enlace acetal, el acetal resultante se denomina amino glucósido). Los acetales son rápidamente hidrolizados por los ácidos; la base de esta prueba es que la esculina es hidrolizada a esculetina, liberando moléculas de glucosa.

La esculetina reacciona con una sal de hierro para formar un complejo castaño oscuro o negro.

### Medio

#### Ingredientes

Peptona	5g	
Extracto de carne	3g	
Esculina	1g	
Citrato de hierro	0.5g	
Agar	15g	
Agua destilada		1000 ml

#### Método de preparación

Pesar exactamente las cantidades de cada producto.

Rehidrata con agua destilada.

La solución se calienta suavemente.

Colocar 2ml de esta en tubos de ensaye

Esterilizar a 121° C, 15 lb, 15 min.

Se deja enfriar el medio manteniendo el tubo inclinado.

Inoculación de un cultivo puro de 24h, inocular en el pico de la flauta en “cola de pescado” e incubar a 35° C revisar periódicamente a las 24, 48 y hasta 72h antes de dar un informe negativo.

Interpretación: Preueba +: Presencia de un color negro o castaño en la mitad o más de la superficie.

Prueba -: no se produce ennegrecimiento en el medio.

## Citrato

Principio.

Determinar si un organismo es capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono para el metabolismo, provocando alcalinidad.

Bases bioquímicas.

Algunas bacterias puede suministrar energía en ausencia de la fermentación o producción de ácido láctico empleando el citrato como única fuente de carbono.

El metabolismo del citrato en la mayoría de las bacterias es rápido a través del ciclo del ácido tricarbóxico o el ciclo de fermentación del citrato. Las bacterias desdoblan el citrato con una enzima denominada citritasa, la enzima requiere un catión bivalente para su actividad y es suministrada por el magnesio o el calcio. Los productos obtenidos del metabolismo de citrato dependen del pH del medio. Si el pH aumenta (alcalino) se produce acetato y formato, con disminución de la producción de lactato y  $\text{CO}_2$ . Por encima de pH 7 no hay producción de lactato y los productos son  $\text{CO}_2$ , ácido fórmico y ácido acético. Con un pH ácido los productos son el acetilmetilcarbinol (acetoina) y el lactato.

El medio utilizado para la fermentación del citrato también incluye sales de amonio inorgánico. Un organismo que es capaz de utilizar el citrato como una fuente de carbono utiliza también sales de amonio como única fuente nitrógeno. Las sales de amonio se desdoblan en amoníaco con la consecuente alcalinidad.

Medio utilizado

Medio de Citrato de Simmons,                      pH 6.9

Ingredientes

Sulfato de magnesio	0.2g
Monofosfato de amonio	
Fosfato de amonio dihidrogenado	1g
Fosfato dipotásico	1g
Citrato de sodio	2g
Cloruro de sodio	5g
Agar	15 a 20 g
Azul de bromotimol	0.02g
Agua destilada	100 ml

### Método de preparación

Pesar la cantidad exacta de polvo del medio comercial.

Rehidrata con agua destilada.

Calentar suavemente hasta su disolución.

Distribuir en tubos, aproximadamente 2ml.

Esterilizaren autoclave a 121° C, 15 lb, 15 min.

Se deja enfriar el medio manteniendo el tubo inclinado.

### Inoculación

Tomar de un cultivo puro e inocular el pico de la flauta en “cola de pescado” e incubar a 35° C de 24 a 48 h. a veces es necesaria una incubación hasta de 4 días.

### Interpretación

Prueba +: crecimiento con un color azul intenso en el pico de la flauta.

Prueba -: no se observa cambio de color.

## **Arginina**

### Principio

Medir la capacidad enzimática de un organismo para decarboxilar un aminoácido (arginina) para formar una amina, con la consiguiente alcalinidad.

### Bases bioquímicas.

La decarboxilación es el proceso por el cual las bacterias que poseen enzimas decarboxilasas específicas son capaces de atacar a los aminoácidos en un grupo carboxilo dando una amina o una diamina y anhídrico carbónico.

Las enzimas descarboxilasas son numerosas y cada una es específica para un sustrato determinado. La arginina es una decarboxilasa producida por algunos organismo en un medio ácido en presencia de un sustrato específico y los productos de la decarboxilación provocan la alcalinidad.

El proceso de la decarboxilación es irreversible, no oxidativo y requiere una coenzima, el fosfato de piridoxal. El aminoácido L-arginina es catabolisada a través de dos sistemas que pueden ocurrir simultáneamente o separadamente.



Estos dos sistemas son: el sistema arginina – dehidrolasa y el sistema arginina-decarboxilasa.

Es el sistema decarboxilasa, la L-arginina sufre la decarboxilacion para dar agmatina, la cual es desdoblada por la enzima agmatinasa a dos compuestos putresina y urea (si está presente la ureasa en  $\text{CO}_2$  y  $\text{HN}_3$ ).

En el sistema dehidrolasa la L-arginina es desdoblada a L-citrulina, amoniaco y fosfato inorgánico, después la L-citrulina es desdoblada a ornitina y carbamifosfato. Si un organismo es capaz de descomponer la L-arginina en La ornitina esta será degradada a putrecina y anhídrido carbónico.

#### Medio

Base de decarboxilasa de Muelle, pH: 6

#### Ingredientes

Peptona (pepsina)	5g
Extracto de carne	5g
Purpura de bromocresol	0.1g
Rojo de cresol	0.005g
Piridoxal	5g
Glucosa	0.5g
Agua destilada	1000 ml

#### Preparación

Pesar la cantidad exacta de cada uno de los reactivos.

Rehidratar con agua destilada.

Calentar suavemente hasta la disolución.

Agregar 10g de L-arginina.

Vaciar a tubos aproximadamente 2 ml.

Esterilizar en autoclave a  $121^\circ\text{C}$ , 15 lb, 15 min.

Dejar enfriar.

#### Inoculación

Tomar de un cultivo puro y re suspender en el medio y cubrir con una capa de aceite mineral (el oxígeno del medio va ha ser consumido por el microorganismo y se controla el pH), incubar a  $35^\circ\text{C}$  de 24 h a 4 días con exámenes diarios. A veces es necesaria una incubación prolongada de 6 a 10 días. Interpretación Prueba + : púrpura turbio. Prueba - : color amarillo claro y brillante.

## **Gelatina**

### **Principio**

Determinar la capacidad de un organismo de producir enzimas de tipo proteolítico (gelatinaza) que licuan la gelatina.

### **Bases Bioquímicas**

Se incorpora gelatina a diversos medios para determinar la capacidad de los organismos de producir enzimas de tipo proteolítico que, a su vez, son detectadas por la digestión o licuefacción de la gelatina presente. Estas enzimas, que son capaces de gelatinólisis, se denominan gelatinazas.

Las proteínas que se producen naturalmente son demasiado grandes para entrar en una célula bacteriana; por lo tanto, para que una célula utilice las proteínas, primero deben de ser catabolizadas a componentes más pequeños, en este caso el resultado final del catabolismo son aminoácidos individuales.

### **Medio**

Medio de gelatina nutritiva para punción pH: 6.8

### **Ingredientes**

Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g
Gelatina	120 g
Agua destilada	1000 ml

### **Preparación**

Se agrega la gelatina al agua y se deja reposar de 15 a 30 min.

Calentar hasta que hierva para que se disuelva la gelatina.

Agregar el extracto de carne y la peptona y volver a calentar hasta ebullición para disolución.

Ajustar el pH a 6.8 o 7.

Vaciar en tubos aproximadamente 2 ml.

Esterilizar en autoclave a 121°C, 15 lb, 15 min.

Dejar enfriar.

Inoculación.

Se toma de un cultivo puro y se inocula por punción. Incubar a 35°C por 24 h a 14 días. Revisar diariamente, al término de cada periodo de 24 h colocar los tubos en un refrigerador aproximadamente y leer.

Interpretación

Prueba +: medio licuado.

Prueba -: medio se mantiene sólido.

## **Indol**

Principio.

Determinar la capacidad de un organismo de desdoblar el indol de la molécula triptófano.

Bases bioquímicas.

La degradación de triptófano libera indol, ácido pirúvico, amoníaco y energía. La presencia de indol puede ser detectada por un reactivo que posea una combinación química que produce un color definido. El reactivo utilizado es el reactivo de Kovac que contiene un aldehído que se combina con el indol produciéndose un color rojo.

Medio.

Medio SIM

Método de preparación.

Pesar la cantidad exacta de polvo del medio comercial.

Rehidratar con agua destilada

Calentar suavemente hasta su disolución.

Distribuir en tubos, aproximadamente 2 m.l

Esterilizar con autoclave a 121°C, 15 lb, 15 min.

Dejar enfriar.

Inoculación.

Tomar de un cultivo puro e inocular por picadura, incubar a 35°C por 24 a 48 h.

Reactivo.

Reactivo de Kovacs

Alcohol amílico o isoamílico 150 ml.

P-imetilamino-benzaldehido 10 g

HCl concentrado 50 ml.

Utilización del reactivo

Adicionar 5 gotas del reactivo y agitar suavemente.

Interpretación

Prueba +: un anillo de color rojo en la superficie del medio.

Prueba -: no se produce color.

## **Motilidad**

Principio: Determinar si un organismo es móvil o inmóvil. Las bacterias tienen motilidad por medio de sus flagelos, que se encuentran principalmente los bacilos. Las bacterias móviles pueden contener un solo flagelo o muchos.

Medio

Medio SIM

Método de preparación.

Pesar la cantidad exacta de polvo del medio comercial.

Rehidratar con agua destilada.

Calentar suavemente hasta su disolución.

Distribuir en tubos, aproximadamente 2 ml.

Esterilizar con autoclave a 121°C, 15 lb, 15 min.

Dejar enfriar.

Inoculación

Tomar de un cultivo puro e inocular por picadura, incubar a 35°C por 24 a 48 h.

Interpretación

Prueba + = los organismos móviles migran de la línea de siembra y se difunden en el medio, provocando turbiedad. Puede mostrar un crecimiento en estrías vellosas.

Prueba - = crecimiento bacteriano acentuado siguiendo la línea de siembra; el medio circundante se mantiene claro.

## Reducción de nitrato

Principio.

Determinar la capacidad de unos organismos de reducir los nitratos o en nitrógeno libre.

Bases Bioquímicas.

La reducción de nitrato en nitrito y en gas nitrógeno tiene lugar generalmente en condiciones anaeróbicas, en las cuales un organismo obtiene oxígeno del nitrato. La mayoría de las bacterias aeróbicas son anaerobios facultativos y sólo pueden reducir el nitrato en ausencia de oxígeno. Esta respiración anaeróbica es, un proceso por el cual las sustancias inorgánicas, especialmente nitrato y sulfato proporcionan oxígeno para suministrar energía.

Las posibilidades del producto final de reducción del nitrato son muchas: nitrito, amoníaco, nitrógeno molecular, óxido nítrico, óxido nitroso o hidroxilamina. El producto final de la reducción que se forme depende de la especie bacteriana. El más común es nitrógeno molecular (gas) por medio de la reducción del nitrito.

Medio

Medio de nitrato de potasio

Ingredientes:

Extracto de carne	3g
Peptona	5g
Nitrato de potasio	1g
Agar	12g
Agua destilada	1000g

Método de preparación

Pesar las cantidades exactas de cada uno de los reactivos.

Rehidratar con agua destilada.

Calentar suavemente hasta su disolución.

Distribuir en tubos, aproximadamente 2 ml.

Esterilizar con autoclave a 121°C, 15 lb, 15 min.

Dejar solidificar el medio en forma inclinada.

### Inoculación

Tomar de un cultivo puro e inocular en el pico de flauta en cola de pescado y por picadura en la capa profunda, incubar a 35°C por 12 a 24 h.

Reactivos empleados para la lectura.

Reactivo A: -naftilamina 0.5%

Reactivo B: ácido sulfanílico 0.8%.

Agregar directamente al tubo una pizca de cinc en polvo, el color se produce en 30s. La reducción del nitrato en nitrito está indicada por la aparición de color cuando el nitrito reacciona con los dos reactivos. La reacción de color resultante se debe a la formación de un compuesto diazoico p-sulfobenceno-azo-naftilamina, el enlace azo da como resultado un compuesto coloreado. La reducción de la sal diazoica por el agente reductor polvo de cinc, en presencia del ácido acético, produce un compuesto coloreado, la arilhidracina.

### Interpretación

Reducción de nitrato a nitrito

Prueba +: color rosado a rojo intenso.

Prueba - : no se desarrolla color.

Reducción de nitrito

Prueba +: sin desarrollo de color.

Prueba - : color rosado o rojo intenso.

## Oxidación –fermentación

Principio: Determinar el metabolismo oxidativo o fermentativo de un hidrato de carbono.

Bases bioquímicas.

La utilización que una bacteria hace de los hidratos de carbono tiene lugar por alguno de dos procesos, de fermentación o de oxidación. La fermentación es un proceso anaeróbico, por medio de este proceso un hidrato de carbono es metabolizado (o fermentado) y desdoblado en dos moléculas triosa de carbono que a su vez son convertidas en cierto número de compuestos con 1,2,3 o 4 carbonos, el intermediario clave es el ácido pirúvico. El ciclo fermentativo principal de la glucosa es el ciclo de Embden-Meyerhof. La oxidación de la glucosa es un proceso aeróbico y los oxidadores bacterianos son por lo general aerobios obligados. En el proceso de oxidación, la glucosa u otros hidratos de carbono no son degradados ni desdoblados a dos moléculas de triosa, al contrario el grupo aldehído es oxidado directamente en grupo carbonilo formado ácido glucurónico que es oxidado a su vez en un ácido 2-cetoglucónico, este puede acumularse o degradarse nuevamente para formar 2 moléculas de ácido pirúvico. La fermentación produce un acidez más elevada que el proceso metabólico oxidativo.

Medio.

Medio básico de Hugh y Leifson PH7.1

Ingredientes

Peptona	2 g
Cloruro de sodio	5 g
Fosfato de sodio	0.3g
Agar	2-3g
Azul de bromotimol	0.03-0.08 g
Agua destilada	1000 ml

Método de preparación.

Pesar la cantidad exacta de polvo del medio comercial.

Rehidratación con agua destilada.

Calentar suavemente hasta su disolución.

Esterilizar con autoclave a 121°C, 15 lb, 15 min.

Preparar las soluciones acuosas al 1% de cada una de los azúcares y esterilizar estos por filtración con membrana milipore.

Dejar enfriar un poco el medio y adicionar la solución del azúcar.

Homogenizar la solución.

Vaciar 2 ml a cada uno de los tubos.

Inoculación.

Tomar de un cultivo puro e inocular por picadura por cada azúcar un par de tubos, a uno de ellos adicionar aceite mineral, inocular ambos tubos a 35°C de 48 h a 7 días.

Interpretación

	Tubo abierto	Tubo cerrado
OXIDACION	Amarillo	Verde
FERMENTACION	Amarillo	Amarillo
NI F, NI O	Azul o verde	Verde



## Ureasa

Principio.

Determinar la capacidad de un organismo de desdoblar la urea, formando dos moléculas de amoníaco por acción de la enzima ureasa.

Bases bioquímicas.

El sustrato urea es una diamida del ácido carbónico, a la que frecuentemente se le conoce como carbamida. Todas las amidas son rápidamente hidrolizadas. La hidrólisis de la urea es catalizada por una enzima específica, la ureasa, para dar dos moléculas de amoníaco. En solución, la urea se hidroliza dando carbonato de amonio como producto final.

La ureasa es una importante enzima microbiana vinculada con la descomposición de los compuestos orgánicos. Medio.

Agar urea de Chrisstensen, pH: 6.8

Ingredientes

Peptona	1g
Cloruro de sodio	5g
Fosfato monopotásico	2g
Glucosa	1g
Urea	20g
Rojo fenol	0.012g
Agar	15-20g
Agua destilada	1000ml

Método de preparación

Urea básica deshidratada.

Pesar exactamente 29g de la base deshidratada.

Disolver en 100 ml de agua desmineralizada.

Esterilizar por filtración.

Agar.

Disolver 15g de agar en 900ml. De agua destilada.

Esterilizar en la autoclave 121°C, 15 lb, 15 min.

Enfriar hasta 50°C.

Agregar los 100 ml de base de urea y mezclar.

Distribuir en tubos aproximadamente 3 ml.

Inoculación.

De un cultivo puro inocular en el pico de flauta en cola de pescado e incubar a 35°C de 6 a 24 h y todos los días siguientes durante 6 días.

Interpretación.

Reacción + : color rojo rosado intenso.

Reacción - : no se produce cambio de color.

## 19. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

### 19.1 Preparaciones de soluciones de antibióticos

Solución Madre de Amikacina (928 ug/mg), Aztreonem (475 ug/mg), Ceftazidima (937 ug/mg), Tobramicim (953 ug/mg), Piperazina/Tazobactam (991/474 ug/mg), Cefepima (662 ug/mg), Imipenem (965 ug/mg), Meropenem (999 ug/mg), Ciprofloxacino (545 ug/mg) y Levofloxacino (965 ug/mg).

Pesar la cantidad de antibiótico puro necesario, basándose en la siguiente fórmula:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Volumen (10ml)} \times \text{Concentración 1280 (\mu\text{g/ml})}}{\text{Potencia (\mu\text{g/ml})}}$$

Preparación de antibióticos:

Volumen: 20ml

Concentración: 2560 ug/ml.

Potencia: varía según el antibiótico

Disolver el antibiótico pesado en una cantidad mínima de solvente apropiado (algunos antibióticos requieren solventes diferentes al agua esto se muestra en la tabla 5.

Agregar agua o solución reguladora hasta aforar a 20 ml de acuerdo a lo que muestra la tabla 5.

Preparar 10 tubos y hacer diluciones seriadas 1:2 para obtener soluciones de antibiótico a las siguientes concentraciones 1280, 640, 320, 160, 80, 40, 20, 10, 5 y 2.5ml

Antibiótico	Potencia (ug/ml)	Solventes	Diluyente
<b>Cefepima</b>	515.3	Solución reguladora de fosfatos pH = 6, 0.1M	solución reguladora de fosfatos pH =6, 0.1M
<b>Ceftazidima</b>	925.44	Agua	Agua
<b>Tobramicim</b>	1000	Agua	Agua
<b>Amikacina</b>	931	Agua	Agua
<b>Aztreonem</b>	714.8	Agua	Agua
<b>Levofloxacino</b>	933	½ volumen de agua y 0.1M NaOH hasta disolver	Agua
<b>Ciprofloxacino</b>	1003	Agua	Agua
<b>Imipenem</b>	990	Solución reguladora de fosfatos pH =7, 0.01M	Solución reguladora de fosfatos pH =7,0.01M
<b>Meropenem</b>	997	Agua	Agua

TABLA 5.Solventes y diluyentes empleados para cada antibiótico así como la potencia de cada antibiótico.

Todos los tubos contienen 10 ml de caldo Mueller-Hinton.

Las concentraciones finales para cada tubo son las siguientes

Numero de Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Conc. µg/ml	2560	1280	640	320	160	80	40	20	10	5	2.5

## **19.2 Preparación de placas**

Pesar e hidratar el agar Mueller- Hinton hasta disolver, esterilizar y dejar enfriar a 48-50°C, de ser posible mantener esta temperatura a baño María.

Se toma una dilución antimicrobiana y se deposita 1.5 ml en cada caja de petri, el numero de cajas dependerá de la cantidad de cepas a analizar. Esto se hace con cada una de las diluciones del antimicrobiano, adicionar a cada una de las cajas de petri 13.5 ml de agar y mezclar perfectamente. En general se agrega una parte de solución antimicrobiana a 9 partes de agar liquido (Dilución 1:10). Colocar las placas sobre una superficie horizontal, preparar placas libres de antimicrobianos para ser usadas como control de crecimiento.

Dejar solidificar a temperatura ambiente guardar en bolsas almacenar en refrigeración (4-8°C).

## **19.3 Preparación de inóculo.**

Preparar cultivos de 24 h que estén en agar soya tripticasa, BHI o Muller Hinton, seleccionar de 3 a 5 colonias de cada cultivo puro crecido en placa y transferir a tubos que contengan 4.5ml de caldo BHI o caldo soya tripticasa. Incluir una o dos cepas de referencia, Incubar a 37°C hasta que la turbidez sea visible (2 a 6 h) ajustar la turbidez con el patrón 0.5 de Mac Farland, en caso de exceder la turbidez ajustar con solución salina o caldo.

## **19.4 Inoculación de placas**

En una gradilla colocar ordenadamente las suspensiones bacterianas.

Adicionar una alícuota de cada suspensión bien mezclada en cada uno de los pozos del replicador de Steers depositar de 1 a 2 micro litros de cada inóculo de la superficie de agar con ayuda del replicador. Inocular primero una placa de control de crecimiento (sin antibiótico) y posteriormente las que contiene antibiótico, comenzando con las de menor concentración una segunda placa de control de crecimiento es inoculada al finalizar cada serie de antibiótico.

Dejar las placas a temperatura ambiente hasta que la humedad de los puntos inoculados se ha absorbido en el agar.

Invertir las placas e incubar a 37°C durante 16 a 24 h.

## 19.5 Lectura e interpretación

Revisar las placas de control de crecimiento para cada una de las series y en todas debe haber crecimiento.

Después tomar la lectura de las cepas bacterianas de referencia de la América Type Culture Collection (ATCC) de los Estados Unidos 27853 de *P. aeruginosa* de cada serie según el comité nacional para la normalización de los Laboratorios Clínicos (CLSI). Donde la CIM es la concentración más baja del agente antimicrobiano que inhibe completamente el tratamiento los puntos de corte de cada antibiótico son los de la tabla 6.

ANTIBIÓTICO	PUNTO DE CORTE(ug/ml)
Pierazina/Tazobactam	128-4 / 64-4
Ceftazidima	8-32
Aztreonem	8-64
Cefepima	1-8
Imipenem	1-4
Meropenem	0.25-1
Amikacina	1-4
Tobramicim	0.5-2
Ciprofloxacino	0.25-1
Levofloxacino	0.5-4
Gentamicina	8-32

**Tabla 6 Puntos de corte para la cepa ATCC 27853 de *Pseudomonas aeruginosa* según la CLSI para cada antibiótico**

Ya que se tienen las lecturas se procede a determinar si las cepas son sensibles, intermedias o resistentes de acuerdo con los valores de la tabla 6.

ANTIBIOTICO	CIM(ug/ml)		
	S	I	R
<b>Piperazina/Tazobactam</b>	<64/4	--	>128/2
<b>Ceftazidima</b>	<8	16-32	>64
<b>Estrepen</b>	<8	16-32	>64
<b>Cefepima</b>	<8	16	>32
<b>Imipenem</b>	<4	8	>16
<b>Meropenem</b>	<4	8	>16
<b>Amikacina</b>	<16	32	>64
<b>Tobramicim</b>	<4	8	>16
<b>Ciprofloxacino</b>	<1	2	>4
<b>Lebofloxacino</b>	<2	4	>8
<b>Gentamicina</b>	<2/38	--	>4/76

Tabla 7. Puntos de corte para *Pseudomona aeruginosa* en la interpretación CIM según la CLSI.

Considerando entonces que las cepas serán considerada:

Sensibles(S)

La categoría de sensible indica que la infección puede ser apropiadamente tratada con la dosis recomendada del agente antimicrobiano.

Intermedio (I)

La categoría de intermedio indicara que el microorganismo será susceptible si se emplea dosis elevadas o si la infección está limitada a los tejidos y líquidos en los cuales se alcanzan niveles antibióticos altos.

Resistente (R)

Los organismos resistentes no son inhibidos por las concentraciones sistémicas normalmente logrables del agente con dosificación normal fija y/o se desploma el rango donde los mecanismos de la resistencia microbiana específicos son que la eficacia probable y clínica no ha sido fiable en estudios del tratamiento.

## **6.5 Detección fenotípica de Metallo-betalactamasa**

Preparar cultivos de 18 h que estén en agar soya tripticasa, BHI o Mueller Hinton.

Seleccionar de 3 a 5 colonias de cada cultivo puro crecido en placa y transferir a tubos que contengan 4.5ml de caldo BHI o caldo soya tripticasa. Incluir una o dos cepas de referencia.

Incubar a 35°C hasta que la turbidez sea visible (2 a 6 h) ajustar la turbidez con el patrón 0.5 de Mac Farland, en caso de exceder la turbidez ajustar con solución salina o caldo

Diluir la suspensión bacteriana 1:10 para obtener una concentración 10 unidades formadoras de colonias (UFC)/ml

## **6.6 Inoculación de las placas**

En una gradilla colocar ordenadamente las suspensiones bacterianas

Con un aplicador inocular masivamente las placas de agar Muller-Hinton

Colocar un disco al cual se les aplicara 10ul de EDTA (0.025 ul) y discos comerciales Imipenem (IMP), y meropenem (MERO), a 15 mm de distancia de centro a centro sin EDTA, y dos discos más de (IMP) y (MERO), a los cuales se les aplicara 10 ul de EDTA.

Dejar las placas a temperatura ambiente hasta que la humedad de los puntos inoculados se ha absorbido en el agar.

Invertir las placas e incubar a 37°C durante 16 a 24 h

El aumento del halo en la zona de los discos contenido EDTA fue interpretado como presencia de Metallo-Betalactamasas.



## 6.7 Interpretación de resultados

Para concluir se expresa fenotípicamente se tiene que cumplir los siguientes requisitos

- 1.- El testigo de antibióticos, valido la prueba
- 2.- El disco de EDTA, cuya agregación no haya inhibido el crecimiento.
- 3.- El halo de inhibición de los discos con antibiótico mas EDTA, sea más grande al que se presenta en el disco que contiene solo antibiótico, no importando el diámetro.

## 20. Diversidad clonal de los aislamientos por electroforesis de campos pulsados

Preparar cultivos de 18 h que estén en agar soya tripticasa, BHI o Mueller Hinton.

Seleccionar de 3 a 5 colonias de cada cultivo puro crecido en placa y transferir a tubos que contengan 4.5ml de caldo BHI o caldo soya tripticasa. Incluir una o dos cepas de referencia.

Incubar a 37°C hasta que la turbidez sea visible (2 a 6 h) ajustar la turbidez con el patrón 0.5 de MacFarland, en caso de exceder la turbidez ajustar con caldo.

Lavar con solución salina EDTA, (1min. 5000 rpm) y decantar

Agregar 1 ml de sol. PIV (TRIS-HCl 2M (PH 7.6) + NaCl 5M+ agua destilada esteril)

Colocar 200 ul en bloques de agarosa de bajo punto de fusión

Colocar en un recipiente de plástico y agregar 1 ml de sol. de lisis e incubar una hora

Decantar la solución y agregar 1 ml de sol. EDTA (PH 9-9.5)0.5M+Proteinasa K+sarcosil 20%

Incubar a 50°C/48hrs

Decantar la solución y agregar regulador TE contenido solución fluorada de fenilmetilsulfonil.

Hacer 3 lavados con TE por 10 minutos cada uno

Decantar y hacer 3 cortes del gel agarosa de ¼ e incubar a temperatura ambiente por 20 minutos

Colocar en otro recipiente de plástico y lavar con solución tris EDTA y decantar

Incubar con regulador de la enzima SpeI/30 minutos

Se obtendrán fragmentos de 40 a 20 Kb t se correrán a 9 volts a 14°C/30 horas/ 11 minutos.

Realizar corrimiento en el equipo de campos pulsados.

### **21.0 Electroforesis.**

La electroforesis se realizó en una cámara de electroforesis, el gel fue cubierto con 2.000 ml de TBE 0.5, el equipo que se utilizó fue CHEF DRI (Bio-Rad). Las condiciones de corrimiento fueron las siguientes:

Temperatura de corrimiento se fijó en 14<sup>0</sup>C; el total de tiempo de ejecución fue de 11 horas, con intervalos pulsados de, 2 segundos a 20 segundos; con un voltaje fue de 6 V/cm.

Los geles fueron revelados durante 30 minutos con 300 ml de solución de bromuro de etidio (0.5ug/ ml) y un lavado de 45 minutos en agua destilada, con agitación suave. los geles se observaron en un transluminador de luz UV y fueron fotografados para su posterior análisis.

### **22.0 Interpretación gráfica de PFGE: análisis de los datos**

Para relizar la interpretación de los patrones obtenidos mediante los PFGE's, las bandas se consideran como caracteres binarios y se evaluaron como "1" cuando hubo presencia y "0" cuando hubo ausencia de ellas. La similitud genética entre pares se estimó mediante el coeficiente de Jaccard con la opción SIMQUA y la matriz de similitud se analizó a través del "Sequential, agglomerative, hierarchical and nested" clustering" (SAHN).

Para obtener la matriz de disimilitud genética y el dendograma, con el fin de analizar gráficamente los patrones de bandeo, obtenidos en los distintos geles de PFGE t así determinar la distancia epidemiológica entre cada especie de aislados de *P. aeruginosa* se empleó el coeficiente de disimilitud de apareamiento simple utilizando el *software* NTSYSpc 2.0, que nos brinda la herramienta para desarrollar el dendograma usando el método de los promedios no ponderados UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages), propuesta por Chun Mei Ying <sup>11</sup> para el análisis de esta técnica específica para *P. aeruginosa*